

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

**TRANSMITTAL
FORM**

(to be used for all correspondence after initial filing)

Total Number of Pages in This Submission

3

Application Number

10/660,499

Filing Date

September 12, 2003

First Named Inventor

Jong Seob LEE

Art Unit

1638

Examiner Name

Brent T. PAGE

Attorney Docket Number

20020-02USA

ENCLOSURES (Check all that apply)

- | | | |
|--|---|---|
| <input type="checkbox"/> Fee Transmittal Form | <input type="checkbox"/> Drawing(s) | <input type="checkbox"/> After Allowance communication to Technology Center (TC) |
| <input type="checkbox"/> Fee Attached | <input type="checkbox"/> Licensing-related Papers | <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences |
| <input type="checkbox"/> Amendment/Reply | <input type="checkbox"/> Petition | <input type="checkbox"/> Appeal Communication to TC (Appeal Notice, Brief, Reply Brief) |
| <input type="checkbox"/> After Final | <input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application | <input type="checkbox"/> Proprietary Information |
| <input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s) | <input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation | <input type="checkbox"/> Status Letter |
| <input type="checkbox"/> Extension of Time Request | <input type="checkbox"/> Change of Correspondence Address | <input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below): |
| <input type="checkbox"/> Express Abandonment Request | <input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer | Return Receipt Postcard |
| <input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement | <input type="checkbox"/> Request for Refund | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s) | <input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____ | |
| <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/Incomplete Application | Remarks | |
| <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53 | Total Number of Pages in this Submission does not include Priority Documents. | |

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENTFirm
or
Individual nameJoseph Hyosuk Kim, Ph.D.
Reg. No. 41,425
JHK Law

Signature

Harry Sung Lee, Reg. No. 56,814

Date

January 5, 2006

CERTIFICATE OF TRANSMISSION/MAILING

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to the USPTO or deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on the date shown below.

Typed or printed name

Harry Sung Lee

Signature

Harry Sung Lee

Date

January 5, 2006

This collection of information is required by 37 CFR 1.5. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to 2 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.



PATENT

I hereby certify that on January 5, 2006, which is the date I am signing this certificate, I am depositing this correspondence and all identified attachments with the U.S. Postal Service, postage prepaid, in an envelope addressed to Mail Stop Amendment, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Harry Lee

Applicant: **Jong Seob LEE**

Serial No.: **10/660,499**

Filed: **September 12, 2003**

Confirmation No.: **5678**

Title: **ROOT SPECIFIC EXPANSIN
GENE REGULATING ROOT GROWTH
AND OBSTACLE-TOUCHING STRESS
RESISTANCE IN THE PLANT**

Examiner: **Brent T. PAGE**

Art Unit: **1638**

Attorney Docket No.: **20020-02USA**

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Mail Stop Amendment
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Sir:

Enclosed herewith is a certified copy of Korean patent application number KR 10-2003-0019069 filed March 27, 2003 to which the foreign priority is claimed in connection with the above-identified application.

The Commissioner is authorized to charge JHK Law's Deposit Account No. **502486** for any fees required under 37 CFR §§ 1.16 and 1.17 and to credit any overpayment to said Deposit Account No. **502486**.

Respectfully submitted,

Ha-lee, Reg. No. 56,814

January 5, 2006

Date

Joseph Hyosuk Kim, Ph.D.

Reg. No. 41,425

Attorney for Applicants

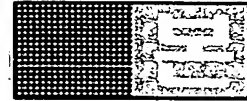
JHK Law

P.O. Box 1078

La Canada, CA 91012-1078

Telephone: (818) 249-8177

Facsimile: (818) 249-8277



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 :
Application Number

10-2003-0019069

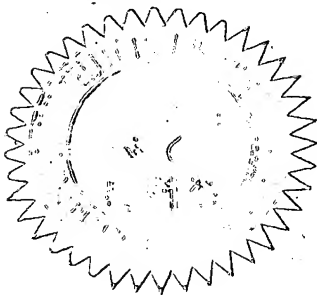
**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

출원년월일 :
Date of Application

2003년 03월 27일
MAR 27, 2003

출원인 :
Applicant(s)

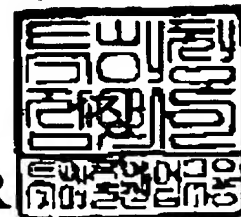
재단법인서울대학교산학협력재단
Seoul National University Industry
Foundation



2005년 12월 05일

특허청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2005.03.18
【제출인】	
【명칭】	재단법인서울대학교산학협력재단
【출원인코드】	2-2003-007067-6
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0019069
【출원일자】	2003.03.27
【심사청구일자】	2003.03.27
【발명의 명칭】	식물의 뿌리 발달 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 뿌리 발달 촉진방법
【제출원인】	
【발송번호】	9-5-2004-0545522-81
【발송일자】	2004.12.23
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음

【취지】

특허법시행규칙 제13조 · 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인
김석현 (인)

【수수료】

【보정료】 3,000원

【추가심사청구료】 0원

【기타 수수료】 0원

【합계】 3,000 원

【첨부서류】 1.보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정서】

【보정대상항목】 식별번호 122

【보정방법】 정정

【보정내용】

<122> 형질전환된 담배 뿌리의 산성 환경에서의 성장 정도를 조사하기 위하여, *GmEXP1* 유전자를 높은 수준으로 발현하는 형질전환체는 불임이기 때문에 *GmEXP1* 유전자를 낮은 수준으로 발현하는 형질전환체를 자가수정하고 T₂ 세대에서 동형접합자의 종자를 수득하였다. 상기 T₂ 종자들을 10% 블리치(bleach) 용액으로 10분간 표면을 살균한 후 멸균수로 수회 세척하였다. 상기 종자를 0.5 X MS 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 포함하며 pH가 각각 4.5 또는 7.0으로 조절된 1.5%(w/v) 아가 플레이트에 파종하였다. 이때 대조군으로 야생형 담배의 종자를 동일한 방법으로 아가 플레이트에 파종하였다. 동일한 시기에서 발아시키기 위해 상기 플레이트를 춘화 처리한 후(암조건에서 2일간 저온 처리) 각각의 플레이트를 수직으로 세워 26℃로 장일 조건(16시간 낮/8시간 밤) 하에서 성장시켰다. 발아 후 17일에 식물체의 1차 근의 길이를 측정하였다.

【보정대상항목】 식별번호 125

【보정방법】 정정

【보정내용】

<125> 실험 결과, 장애물 접촉 스트레스를 주지 않은 야생형 담배의 1차 근은 아래를 향하여 일직선으로 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 한편, 장애물 접촉 스트레스를 가한 야생형 담배의 1차 근의 뿌리 길이가 줄어드는 것으로 나타났다. 즉, 야생형 담배에 장애물 접촉 스트레스를 가하지 않은 경우에 평균 뿌리 길이가 3.5cm였으나 장애물 접촉 스트레스를 가한 경우에 평균 뿌리 길이가 1.1cm로 줄어들었다. 그러나, *GmEXP1* 유전자를 과다 발현하는 형질전환체의 1차 근은 장애물 접촉 스트레스의 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났으며, 야생형에 비해 1차 근의 길이가 긴 것으로 나타났다(도 15). 이러한 결과로부터 *GmEXP1* 유전자의 과다 발현이 장애물 접촉 스트레스에 대한 내성을 부여한다는 사실을 확인할 수 있었다. 따라서, 식물체가 토양에서 성장할 때 받는 스트레스를 극복하는데 있어서 *GmEXP1* 유전자가 중요한 역할을 수행한다는 것을 알 수 있었다.

【보정대상항목】 식별번호 127

【보정방법】 정정

【보정내용】

<127> 상기 실시예 9-3)과 동일한 방법으로 야생형 담배와 형질전환된 담배를 1.5%(w/v) 아가 플레이트(pH 4.5)에 파종한 후 45℃로 기울여 장애물 접촉 스트레스를 주었다. 이를 26℃에서 장일 조건(16시간 낮/8시간 밤)하에서 성장시켰다. 발아 후 17일에 식물체의 뿌리와 줄기의 상피세포 길이를 측정하였다. 상피세포

길이는 NIH 이미지 소프트웨어(United States National Institutes of Health and avaiabel, <http://rsb.info.nih.gov/niimage>)를 사용하여 측정하였다.

【보정대상항목】 식별번호 129

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 1】

<129> 야생형 대두와 형질 전환체의 뿌리 상피세포 길이

뿌리 말단으로부터의 거리(μm)	세포길이(μm)	
	야생형 담배	형질전환된 담배
400	17.6 ± 3.9	30.2 ± 6.9
800	32.0 ± 5.0	71.9 ± 15.7
1,200	140.5 ± 21.6	216.0 ± 25.5
1,600	188.7 ± 33.7	207.9 ± 30.7

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 1】

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 식물의 뿌리 발달 조절 단백질.

【보정대상항목】 청구항 5

【보정방법】 정정

【보정내용】**【청구항 5】**

제3항 또는 제4항에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 *GmEXP1* 유전자.

【보정대상항목】 청구항 7**【보정방법】** 정정**【보정내용】****【청구항 7】**

제6항에 있어서, 제5항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pGA643/*GmEXP1*.

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.06.24
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	대한민국(서울대학교 총장)
【출원인코드】	2-2000-047513-2
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	(재)서울대학교 산학협력재단
【출원인코드】	2-2003-007067-6
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0019069
【출원일자】	2003.03.27
【심사청구일자】	2003.03.27
【발명의 명칭】	식물의 뿌리 발달 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의뿌리 발달 촉진방법
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0042858
【출원일자】	2002.07.22
【심사청구일자】	2002.07.22
【발명의 명칭】	p 43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0018424
【출원일자】	2003.03.25
【심사청구일자】	2003.03.25
【발명의 명칭】	p 38 / J T V - 1을 유효성분으로 하는 암 치료용 약학적조 성물 및 암 치료용 약학적 조성물의 스크리닝 방법

【변경원인】

전부양도

【취지】

특허법 제38조제4항 · 실용신안법 제20조 · 의장법 제24조 및
상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니

다. 구명의인

대한민국(서울대학

교 총장) (인) 신명의인

(재)서울

대학교 산학협력재단 (인)

【수수료】

39,000 원

【첨부서류】

1.기타첨부서류[출원인변경의 원인을 증명하는 서류]_1통

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2003.03.27
【발명의 국문명칭】 식물의 뿌리 발달 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 뿌리 발달 촉진방법
【발명의 영문명칭】 Gene controlling root development of plants and method for manipulating root development of plant using the same
【출원인】
【명칭】 대한민국(서울대학교 총장)
【출원인코드】 2-2000-047513-2
【대리인】
【성명】 김석현
【대리인코드】 9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】 2002-054274-7
【발명자】
【성명의 국문표기】 이종섭
【성명의 영문표기】 LEE, Jong Seob
【주민등록번호】 540108-1056510
【우편번호】 135-270
【주소】 서울 강남구 도곡동 91-5 삼성래미안아파트 107-101호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이동근
【성명의 영문표기】 LEE, Dong-Keun

【주민등록번호】 730102-1156316
【우편번호】 157-925
【주소】 서울시 강서구 화곡 7동 1084번지 4통 4반
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 안지훈
【성명의 영문표기】 AHN, Ji Hoon
【주민등록번호】 660119-1565810
【우편번호】 158-077
【주소】 서울 양천구 신정7동 목동신시가지 12단지 1212동 303호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 송상기
【성명의 영문표기】 SONG, Sang-Kee
【주민등록번호】 690207-1074432
【우편번호】 135-951
【주소】 서울시 강남구 청담동 43-1 현대빌라 602호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 최양도
【성명의 영문표기】 CHOI, Yang Do
【주민등록번호】 530315-1701811
【우편번호】 137-030
【주소】 서울시 서초구 잠원동 신반포아파트 301-907호
【국적】 KR
【공지에외적용대상증명서류의 내용】
【공개형태】 전기통신회선을 통한 발표
【공개일자】 2003.01.02

【공지에외적용대상증명서류의 내용】**【공개형태】** 전기통신회선을 통한 발표**【공개일자】** 2003.03.19**【심사청구】** 청구**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】****【서열개수】** 9**【서열목록의 전자문서】** 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

김석현 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 39 면 39,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 15 항 589,000 원**【합계】** 657,000 원**【면제사유】** 국가**【면제후 수수료】** 0 원

【첨부서류】 1.요약서·명세서(도면)_1통 2.공지에외적용대상(신규성상
실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받 기 위한 증명서류[
전기통신회선을 통한 발표]_2통

【요약서】

【요약】

본 발명은 식물의 뿌리 발달 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 뿌리 발달 촉진방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 대두(*Glycine max*)로부터 분리한 식물의 뿌리 발달 조절 유전자 *GmEXP1*, 상기 유전자에 의해 암호화되는 익스판신(expansin) 단백질 및 상기 유전자를 식물체에서 과다 발현시킴으로써 식물의 뿌리 발달을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 분리된 *GmEXP1* 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 익스판신 단백질은 식물의 뿌리 발달과 관련된 형질의 개선 및 타 식물체에서 뿌리 발달 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 식물의 뿌리 발달을 촉진함으로써 식물체의 성장을 촉진시킬 수 있는 효과가 있다.

【대표도】

도 15

【색인어】

뿌리 발달, 유전자, 익스판신

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 뿌리 발달 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 뿌리 발달 촉진방법
 {Gene controlling root development of plants and method for manipulating root
 development of plant using the same}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 본 발명의 *GmEXP1* 유전자와 α -엑스판신 유전자의 염기서열을 다중
 서열 정렬(multiple sequence alignment)한 결과이다.
- <2> 도 2는 본 발명에 따른 *GmEXP1* 유전자의 계통도를 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 대두의 게놈 내에 존재하는 *GmEXP1* 유전자를 서던 블롯(Southern
 blot)으로 분석한 결과이다(A: *GmEXP1* 유전자의 코딩 영역만을 포함하는 탐침으로
 혼성화한 경우, B: *GmEXP1* 유전자의 코딩 영역의 일부와 3' 미번역 영역을 포함하
 는 *GmEXP1* 유전자 특이적인 탐침으로 혼성화한 경우, RV : *EcoRV*로 절단, H:
*HindIII*로 절단, N: *NcoI*으로 절단).
- <4> 도 4는 대두 조직의 종류에 따른 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯
 (northern blot)으로 분석한 결과이며, 25S rRNA는 대조군(internal control)이다
 (A: 잎, B: 줄기, C: 배축, D: 뿌리).
- <5> 도 5는 대두 뿌리의 발달 단계에 따른 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 노던 블

롯으로 분석한 결과이며, 25S rRNA는 대조군(internal control)이다.

- <6> 도 6은 대두의 1차 근, 2차 근 및 3차 근의 성장 패턴을 나타낸 그래프이다 (◆: 1차 근, ■: 2차 근, ▲: 3차 근).
- <7> 도 7은 발아 후 5일된 대두의 1차 근과 2차 근에서 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯으로 분석한 결과이며, 25S rRNA는 대조군(internal control)이다 (A: 뿌리 전체, B: 1차 근, C: 2차 근).
- <8> 도 8은 대두 뿌리에서 *GmEXP1* 유전자의 공간적 발현 패턴을 노던 블롯으로 분석한 결과이며, 25S rRNA는 대조군(internal control)이다(A: 5일된 대두 전체 뿌리 절편의 모식도, B: A에서 얻은 절편을 대상으로 수행한 노던 블롯 결과, C: 9일된 대두의 2차 근 절편의 모식도, D: C에서 얻은 절편을 대상으로 수행한 노던 블롯 결과).
- <9> 도 9는 대두의 1차 근을 세로로 절단한 절편을 이용하여 *GmEXP1* 유전자의 공간적 발현 패턴을 조직 내 유전자 혼성화법(in situ hybridization)으로 분석한 결과이다(A: *GmEXP1* 유전자의 안티센스 탐침으로 혼성화한 결과, B: *GmEXP1* 유전자의 센스 탐침으로 혼성화한 결과, C: A에서 신장대 부분을 확대한 사진, rc: 근관, e: 상피세포, m: 분열조직, c: 피층조직, v: 관다발 조직, A와 B의 스케일 바: 250 μ m, C의 스케일 바: 100 μ m).
- <10> 도 10은 대두의 1차 근을 가로로 절단한 절편을 이용하여 *GmEXP1* 유전자의 공간적 발현 패턴을 조직 내 유전자 혼성화법으로 분석한 결과이다(A: 뿌리 말단으로부터 80 μ m 떨어진 부위, B: 뿌리 말단으로부터 1.0mm 떨어진 부위, C: 뿌리 말

단으로부터 1.3mm 떨어진 부분, D: 뿌리 말단으로부터 4.0mm 떨어진 부위, rc: 근관, e: 상피세포, m: 분열조직, c: 피층조직, v: 관다발 조직, A의 스케일 바: 50 μm , B, C, D의 스케일 바: 100 μm)

<11> 도 11은 대두의 2차 근이 발생되기 시작할 때 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 조직 내 유전자 혼성화법으로 분석한 결과이다(A: 세로 방향 절편을 안티센스 탐침으로 혼성화한 경우, B: 가로 방향 절편을 안티센스 탐침으로 혼성화한 경우, C: 가로 방향 절편을 센스 탐침으로 혼성화한 경우, lri: 2차 근 시작점, e: 상피세포, v: 관다발 조직, c: 피층 조직, 스케일 바=100 μm).

<12> 도 12는 *GmEXP1* 유전자가 과다 발현되는 형질전환 담배의 해부학적 특성을 현미경으로 관찰한 결과이다(A: 야생형 담배 잎의 가로 방향 절편, B: 형질전환 담배 잎의 가로 방향 절편, C: 야생형 담배 줄기의 가로 방향 절편, D: 형질전환 담배 줄기의 가로 방향 절편, E: 야생형 담배 잎자루의 가로 방향 절편, F: 형질전환 담배 잎자루의 가로 방향 절편, e: 상피 세포, pp: 책상 조직(palisade parenchyma), sp: 해면 조직(spongy parenchyma), c: 피층조직, x: 물관, p:속(pith), A와 B의 스케일 바는 300 μm , C와 D의 스케일 바는 1000 μm , E 및 F의 스케일 바는 100 μm).

<13> 도 13은 *GmEXP1* 유전자가 과다 발현되는 형질전환 담배 뿌리를 현미경으로 관찰한 결과이다(왼쪽: 야생형 담배, 오른쪽: 형질전환 담배, 스케일 바는 100 μm).

<14> 도 14는 산성 환경에서 배양한 야생형 담배 뿌리와 *GmEXP1* 유전자가 과다 발현되는 형질전환 담배 뿌리의 길이를 비교한 그래프이다(A: 야생형 담배, B: 형질

전환 담배, C: 형질전환 담배, □: pH 7.0, ■: pH 4.5).

<15> 도 15는 장애물 접촉 스트레스(obstacle-touching stress)를 가한 야생형 담배 뿌리와 *GmEXP1* 유전자가 과다 발현되는 형질전환 담배 뿌리의 길이를 비교한 그래프이다(A: 야생형 담배, B: 형질전환 담배, C: 형질전환 담배, □: 장애물 접촉 스트레스를 가하지 않음, ■: 장애물 접촉 스트레스를 가함).

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<16> 본 발명은 식물의 뿌리 발달 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 뿌리 발달 촉진방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 대두(*Glycine max*)로부터 분리한 식물의 뿌리 발달 조절 유전자 *GmEXP1*, 상기 유전자에 의해 암호화되는 익스판신(expansin) 단백질 및 상기 유전자를 식물체에서 과다 발현시킴으로써 식물의 뿌리 발달을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

<17> 식물의 뿌리는 외부 환경으로부터 물과 영양분을 얻는 기능을 한다(Schiefelbein J. W. et al., *Plant Cell*, 9:1089-1098, 1997). 식물의 뿌리는 기본적으로 상피조직(epidermis), 피층 조직(cortex) 및 관다발 조직(vascular tissues)으로 이루어져 있으며, 이들 조직은 동심원상으로 배열되는 특성이 있다(Esau K.,

Anatomy of Seed Plants, Ed. 2, 215-242, 1997; Dolan L. et al., *Development*, 119:71-84, 1993; Raven P. H. et al., *Biology of Plants*, 6th Ed. Worth Publishers, New York, 1999). 또한, 식물의 뿌리는 세로로 잘랐을 때 세포 분열대(cell division region), 신장대(elongation region) 및 성숙대(maturation region)로 구분된다(Dolan L. et al., *Development*, 119:71-84, 1993; Baluska F. et al., *Plant Physiol.*, 112:3-4, 1996). 상기 세포 분열대는 세포 분열을 수행하는 조직이다. 세포 분열대에서 분열된 세포는 신장대에서 확장되고 신장된다. 신장된 후의 세포는 뿌리털과 2차 근이 발생하는 성숙대에서 분화되기 시작한다. 이러한 뿌리에서의 세포 신장과 성숙은 세포벽의 신장능(extensibility)과 세포 내 팽압(turgor pressure)에 의해 조절된다(Cosgrove D. J., *Bio. Essays*, 18:533-540, 1996).

<18>

한편, 식물 세포의 신장 정도는 세포벽에 의해 제한되는 것으로 알려져 있다. 세포벽은 다당류, 단백질, 페놀화합물 및 기타 물질로 이루어져 있다(Varner J. E. et al., *Cell*, 56:231-239, 1989). 식물의 세포벽은 세포의 크기와 모양을 형성하는데 결정적인 역할을 한다. 그러나, 식물세포가 신장(elongation) 또는 성숙(maturation)하기 위해서는 세포벽을 선택적으로 변형시켜야 할 필요가 있다. 식물세포에서 세포벽을 변형시키는 물질로는 익스판신(expansin), 엔도글루카나제(endoglucanases), 자일로글루칸(xyloglucan), 엔도트랜스글리코실라제(endotrans glycosylases) 및 하이드록실 라디칼(hydroxyl radicals) 등이 알려져 있다(Cosgrove D. J., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:391-417,

1999; Cosgrove D. J., *Plant Physiol. Biochem.*, 38:109-124, 2000a; Cosgrove D. J., *Nature*, 407:321-326, 2000b).

<19> 이 중에서 익스판신은 세포벽의 신장을 위한 가장 중요한 인자로 여겨지고 있다(Vissenberg K. et al., *Plant Cell*, 12:1229-1237, 2000). 익스판신은 셀룰로오스 미세섬유(microfibril)와 매트릭스 폴리머 사이의 수소결합을 느슨하게 함으로써 세포벽의 변형(wall creep)을 야기하는 것으로 알려져 있다(McQueen-mason S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6574-6578, 1994; Cosgrove D.J., *Plant Cell*, 9:1031-1041, 1997). 익스판신 유전자는 최초로 클로닝된 이후(Shcherban T. Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:9245-9249, 1995) 다양한 식물 종으로부터 많은 익스판신 유전자들이 동정되었으며 이들은 다중유전자 족(multigene family)을 형성하는 것으로 알려져 있다(Cosgrove D. J., *Plant Physiol.*, 118:333-339, 1998). 최근에 상기 익스판신 유전자들은 계통발생학적 관계를 기초로 하여 α -, β - 및 γ -엑스판신 아족(subfamily)으로 분류되었다(Li Y. et al., *Plant Physiol.*, 128:854-864, 2002). α -엑스판신은 주로 토마토 (*Lycopersicon esculentum*)(Keller E. et al., *Plant J.*, 8:795-802, 1995), 벼 (*Oryza sativa*)(Cho H-T. et al., *Plant Physiol.*, 113:1137-1143, 1997a), 귀리 (*Avena sativa*)(Li Z-C et al., *Planta*, 191:349-356, 1993), 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)(Cosgrove D. J., *Plant Physiol.*, 118:333-339, 1998; Li Y. et al., *Plant Physiol.*, 128:854-864, 2002)로부터 유래된 것이 주종을 이루는 것으로 알려져 있으며, 상기 α -엑스판신 아족은 다시 A, B, C 및 D의 4개의 그룹

으로 분류되었다(Link B. M. et al., *Plant Physiol.*, 118:907-916, 1998).

<20> α -엑스판신 유전자의 발현 패턴은 특히, 벼와 토마토를 대상으로 심도 있게 연구되었다. 문헌에는 벼에서 세포벽 신장과 빠른 성장이 시작되기 전에 엑스판신 유전자 *OsEXP4*의 전사체 양이 증가한다고 보고된 바 있다(Cho H-T et al., *Plant J.* 15:805-812, 1998). 이는 엑스판신 유전자가 세포 신장과 관련되어 있다는 사실을 뒷받침 해주는 것이다. 또한, 토마토에서 초기의 잎 원기가 발생하는 정단 분열조직 세포에서 엑스판신 유전자인 *LeEXP18* 이 발현된다고 보고된 바 있다(Reinhardt D. et al., *Plant Cell*, 10:1427-1437, 1998). 국제특허공개 제 02086066호에는 식물에서 세포벽 구조를 변형시키는 신규한 β -엑스판신 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 개시된 바 있으며, 미국특허 제592303호에는 과일의 숙성을 조절하는 과일 특이적인 엑스판신 유전자가 개시된 바 있다.

<21> 다양한 종류의 엑스판신 유전자와 이들의 조직-특이적인 발현 패턴에 대한 지금까지의 연구 결과로부터 식물의 기관 발달 동안에 엑스판신 유전자는 각각 다른 역할을 수행할 것으로 생각되고 있다(Rose et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:5955-5960, 1997). 따라서, 새로운 엑스판신 유전자 및 그 기능에 대한 연구는 계속 요구되고 있다.

<22> 이에 본 발명자들은 새로운 엑스판신 유전자를 연구하던 중, 대두로부터 식물의 뿌리 발달을 조절하는 뿌리 특이적인 *GmEXP1* 유전자를 분리하였으며 이를 이용하여 식물체의 뿌리 발달을 조절할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였

다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <23> 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 식물의 뿌리발달 조절 단백질을 제공하는 것이다.
- <24> 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 것이다.
- <25> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- <26> 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 박테리아를 제공하는 것이다.
- <27> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 이용하여 식물체의 뿌리발달을 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.
- <28> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 이용하여 장애물-접촉 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.
- <29> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자 및 단백질을 이용하여 식물의 뿌리발달 조절 유전자 또는 단백질을 선별하는 방법을 제공하는 것이다.
- <30> 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 상기 단백질의 활성 또는 발현에 미치는 효

과를 측정하는 단계를 포함하는 상기 단백질의 활성 또는 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- <31> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 식물의 뿌리발달 조절 단백질을 제공한다.
- <32> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공한다. ... 상기 유전자는 식물에 있어서, 뿌리-특이적으로 발현하는 것을 특징으로 한다.
- <33> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질 전환된 박테리아를 제공한다.
- <34> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 식물체의 뿌리발달을 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.
- <35> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 장애물-접촉 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- <36> 상기 방법들은 식물체에서 상기 유전자를 과다 발현시킴으로써 뿌리 발달을 촉진시키거나 또는 장애물-접촉 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- <37> 또한, 본 발명은 상기 유전자 및 단백질을 이용하여 식물의 뿌리 발달 조절

유전자 또는 단백질을 선별하는 방법을 제공한다.

<38> 또한, 본 발명은 상기 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 상기 단백질의 활성 또는 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 상기 단백질의 활성 또는 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법을 제공한다. 상기 화합물은 본 발명 단백질의 활성 또는 발현을 촉진하는 것을 특징으로 한다.

<39> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<40> 본 발명자들은 새로운 익스판신 유전자를 탐색하기 위하여, 종래에 알려진 익스판신 유전자들의 공통적으로 보존된 부위에 결합하는 탐침을 제조하고 이를 이용하여 대두의 cDNA 라이브러리 탐색함으로써 1개의 양성 클론을 분리하였다. 분리된 클론의 염기서열 및 아미노산 서열을 분석한 결과, 대두로부터 분리된 cDNA는 1089bp의 염기로 구성되어 있으며 255개의 아미노산 서열을 코딩하는 ORF(Open Reading Frame)를 가지고 있음을 알 수 있었다.

<41> 대두로부터 분리된 본 발명의 유전자는 α -엑스판신 족(expansin family)에 속하는 담배, 오이, 벼 및 애기장대의 익스판신 유전자와 높은 상동성을 나타냈다(도 1 참조). 따라서, 본 발명자들은 분리된 본 발명의 유전자를 *GmEXPI*으로 명명하고 이의 염기서열을 진뱅크(Genbank accession 번호: AF516879)에 등록하였다. 또한, 본 발명의 익스판신 유전자 *GmEXPI*을 계통발생학적으로 분류한 결과, α -엑

스판신 아족(α -expansin subfamily)의 D 그룹에 속함을 알 수 있었다(도 2 참조).

<42> 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명에서 분리한 *GmEXP1* 유전자가 실제로 대두의 게놈 내에 존재하는지의 여부를 서던 블롯(Southern blot)으로 조사한 결과, 대두의 게놈 내에는 α -엑스판신과 상동성을 가지는 많은 종류의 엑스판신이 존재하며 본 발명의 *GmEXP1* 유전자는 단일 카피로 존재함을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

<43> 일반적으로 엑스판신 유전자는 식물의 다양한 부분에서 각기 다른 발달 단계에서 발현된다고 알려져 있으며, 대부분의 엑스판신 전사체는 토마토의 잎 원기(leaf primordia), 벼의 줄기 절간(internodes), 옥수수과 대두의 꽃가루(pollen), 담배의 암술, 딸기와 토마토의 열매 및 귀리의 자엽초(coleoptiles)와 같은 활발한 성장 기관에서 풍부하게 존재한다고 알려져 있다. 이는 엑스판신 유전자들이 식물의 중요한 발달 과정과 밀접한 관련이 있다는 것을 의미한다.

<44> 본 발명의 일 실시예에서는 대두의 다양한 조직에서 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯(northern blot) 분석을 수행함으로써 조사하였다. 그 결과, 본 발명의 유전자는 대두의 뿌리에서만 특이적으로 발현됨을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 이에 본 발명자들은 본 발명의 유전자가 대두의 뿌리 발달과 관련이 있을 것으로 추정하고, 대두 뿌리의 발달 단계에 따른 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯 분석법으로 조사하였다. 그 결과, 본 발명의 *GmEXP1* 유전자는 뿌리의 모든 발달 단계에서 발현됨을 확인할 수 있었으며(도 5 참조), 특히 뿌리 신장이 빠르게 일어날 때 유전자의 발현이 상향 조절(up-regulated)됨을 알 수 있었다(도 6

및 도 7 참조).

<45> 나아가 본 발명자들은 대두 뿌리에서 *GmEXP1* 유전자의 공간적 발현 패턴을 노던 블롯 분석법 및 조직내 유전자 혼성화법(in situ hybridization)으로 보다 상세히 분석하였다. 그 결과, 대두 뿌리의 1차 근과 2차 근의 *GmEXP1* 유전자는 세포 분열과 신장에 관여하는 뿌리 말단 영역에서 높게 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한, 결뿌리인 2차 근이 자라기 시작한 부분에서도 *GmEXP1* 유전자가 약간 높게 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러나, 대두 뿌리에서 세포분열이 정지된 지역에서는 *GmEXP1* 유전자의 발현이 검출되지 않았다(도 8 참조).

<46> 또한, *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 조직내 유전자 혼성화법으로 분석한 결과 본 발명의 유전자는 대두 뿌리에 있어서 세포 분열대와 신장대에서 발현되며 특히 상피세포와 내부세포층에서 특이적으로 발현함을 알 수 있었다. 이로부터 본 발명에 따른 유전자의 발현은 식물체의 뿌리 발달과 관련이 있음을 알 수 있었다(도 9 및 도 10 참조).

<47> 이에 본 발명의 다른 실시예에서는 본 발명의 *GmEXP1* 유전자와 식물체의 뿌리 발달과의 관련성을 보다 상세히 조사하기 위하여 *GmEXP1* 유전자와 대두의 뿌리 형성의 시작과의 관련성을 조직내 유전자 혼성화법으로 조사하였다. 그 결과, 대두의 1차 근에서 2차 근이 시작하는 부분의 상피세포와 새로 생겨난 2차 근의 말단 부분에서 *GmEXP1* 유전자가 높게 발현됨을 확인할 수 있었다(도 11 참조). 따라서, 본 발명에서 분리한 *GmEXP1* 유전자는 식물체의 뿌리에 특이적(root-specific)으로 발현하며 식물체의 뿌리 발달을 조절하는 신규한 유전자임을 확인할 수 있었다.

<48> 본 발명자들은 본 발명의 *GmEXP1* 유전자로 다른 종의 식물체를 형질전환시켜 *GmEXP1* 유전자를 과다발현하는 형질전환체를 제조하였다. 본 발명의 일 실시예에서는 아그로박테리움을 이용하여 *GmEXP1* 유전자를 담배(*Nicotiana tabacum*)에 도입함으로써 *GmEXP1* 유전자가 과다 발현되는 형질전환체를 제조하고 이의 표현형의 변화를 조사하였다. 그 결과, *GmEXP1* 유전자가 과다발현된 형질전환체는 야생형에 비해 그 크기가 상대적으로 크며 잎과 줄기 물관세포의 크기가 크고(도 12 참조) 뿌리 말단 부분이 야생형에 비해 신장되어 있음이 관찰되었다(도 13 참조). 따라서, 본 발명의 *GmEXP1* 유전자의 과다발현이 식물의 뿌리 성장을 촉진함을 확인할 수 있었다.

<49> 한편, 엑스판신 유전자 활성화는 다양한 환경 스트레스에 의해 조절된다고 알려져 있다. 문헌에는 낮은 수분 장력(water potential)이 엑스판신 활성을 증가시킨다고 보고된 바 있다(Wu Y. et al., *Plant Physiol.*, 111:765-772, 1996). 이에 본 발명자들은 상기 *GmEXP1* 유전자가 도입된 형질전환체를 산성 환경 하에서 배양하고 식물체의 성장 정도를 야생형과 비교하였다. 그 결과, *GmEXP1* 유전자가 과다 발현되는 형질전환체가 야생형에 비해 중성과 산성 환경에서 모두 뿌리 성장이 빠르게 일어남을 확인할 수 있었다(도 14 참조).

<50> 한편, 식물체가 토양에서 자랄 때, 식물체의 뿌리 표면은 장애물-접촉 스트레스를 받게 된다. 장애물-접촉 스트레스를 받은 애기장대 뿌리는 구부러진 형태로 자라게 된다고 보고된 바 있다(Okada K. et al., *Science*, 250:274-276, 1990).

따라서, 본 발명의 일 실시예에서는 *GmEXP1* 유전자가 도입된 형질전환체의 장애물 접촉 스트레스(Obstacle-Touching Stress)에 대한 반응을 조사하였다. 그 결과, 본 발명의 형질전환체의 경우에는 장애물-접촉 스트레스 하에서도 야생형에 비해 빠른 성장을 나타냈으며, 장애물-접촉 스트레스를 가하지 않은 대조군과 차이가 나지 않았다(도 15 참조). 이로부터, *GmEXP1* 유전자의 과다 발현은 장애물 접촉 스트레스에 대한 내성을 부여하며 식물체가 토양에서 성장할 때 받는 스트레스를 극복하는데 있어서 중요한 역할을 수행한다는 사실을 알 수 있었다.

<51> 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 형질전환 담배 뿌리의 상피세포의 길이를 측정된 결과, 야생형에 비해 신장되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, *GmEXP1* 유전자를 과다 발현하는 형질전환체의 경우에 뿌리 상피 세포가 빠르게 신장되어 결과적으로 식물체의 성장을 촉진한다는 사실을 확인할 수 있었다.

<52> 따라서, 본 발명은 신규한 식물의 뿌리 발달 조절 단백질을 제공한다. 본 발명에 따른 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상의, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 과다발현시 식물의 뿌리 발달을 촉진하는 활성을 의미한다. 본 발명에 따른 단백질은 자연(예

컨대, 식물 세포)으로부터 추출하거나 또는 본 발명의 단백질을 암호화하는 재조합 핵산의 발현에 의해 또는 화학적 합성에 의해 수득될 수 있다. 특히 바람직하게는, 대두로부터 분리될 수 있다.

<53> 또한, 본 발명은 상기 단백질을 암호화하는 식물의 뿌리 발달 조절 유전자 *GmEXP1*를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시된다. 또한, 본 발명에 따른 식물의 뿌리 발달 조절 유전자는 α -엑스판신 족 유전자들과 높은 상동성을 가지고 있으며 계통발생학적 분류에 의해 α -엑스판신 아족의 D 그룹에 속한다. 본 발명에 따른 유전자는 식물 뿌리에서 특이적으로 발현되며 특히 식물 뿌리의 세포 분열대와 신장대에서 발현되는 특징이 있다.

<54> 상기 본 발명에 따른 식물의 뿌리 발달 조절 유전자는 적합한 발현 벡터 내로 삽입되어 식물세포를 형질전환 할 수 있다. "발현 벡터"라는 용어는 *GmEXP1* 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명의 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열 일 수 있다. "발현 조절 서열

(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 식물 세포 내로 본 발명의 유전자를 도입시키기 위한 적합한 벡터로는 Ti 플라스미드, 뿌리 유도성(Ri) 플라스미드 및 식물 바이러스 벡터가 있다. 상기 적합한 벡터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 당업자라면 본 발명에 따른 유전자의 핵산 서열을 도입시키는 데 적합한 벡터를 선택할 수 있으며, 본 발명에서는 *GmEXPI* 유전자 서열을 식물 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 CaMV 35S 프로모터를 포함하는 pGA643 벡터에 본 발명의 유전자를 도입시킨 pGA643/*GmEXPI* 재조합 벡터가 예시되어 있다.

<55> 본 발명에 따른 재조합 벡터는 당분야에 공지된 방법을 사용하여 식물 세포 내에 도입할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 아그로박테리움 (*Agrobacterium* sp.) 속 미생물을 이용한 형질전환, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylenglycol)에 의한 침전법을 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질 전환된

숙주세포를 제공한다. 상기 숙주세포로는 박테리아가 바람직하며, 그 예로는 대장균 또는 아그로박테리움 속 미생물이 있다.

<56> 또한, 본 발명은 본 발명의 유전자를 이용하여 식물체의 뿌리 발달을 촉진하는 방법을 제공한다.

<57> 또한, 본 발명은 본 발명의 유전자를 이용하여 장애물-접촉 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

<58> 보다 구체적으로, 본 발명은 식물체에서 *GmEXP1* 유전자를 과다발현시킴으로써 식물체의 뿌리 발달을 촉진하거나 또는 장애물-접촉 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

<59> 식물체에서 유전자를 과다 발현시키는 방법으로는 *GmEXP1* 유전자를 포함하고 있는 식물체 또는 *GmEXP1* 유전자를 포함하고 있지 않은 식물체 내로 *GmEXP1* 유전자를 도입함으로써 수행될 수 있다. 상기에서 "유전자의 과다발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 *GmEXP1* 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체내로 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환 하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과다 발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터; 피크워드 모자이크 비루스(FMV)에서 유래한 전장 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다. 또한, 단자엽 식물이나 목본식물체

에서 유전자를 과다발현하기 위해서는 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터를 사용할 수 있다.

<60> 상기 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체로는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물이 포함된다. 상기 단자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 벼, 밀, 보리, 죽순, 옥수수, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마 및 생강이 있다. 쌍자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두가 있다.

<61> 한편, 본 발명의 *GmEXP1* 유전자 및 단백질은 공지된 유전공학적인 방법을 사용하여 식물의 뿌리 발달과 관련된 형질 개선 및 타 식물체의 뿌리 발달 조절 유전자의 탐색에 유용하게 이용될 수 있다. 예를 들면, DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응, 노던 블롯 분석, 서던 블롯 분석, 효소 면역 반응 및 2-D 젤 분석 등을 포함한 다양한 방법을 사용할 수 있다.

<62> 또한, 본 발명은 본 발명의 단백질의 활성 또는 유전자의 발현에 영향을 주는 물질을 동정하는 방법을 제공한다. 구체적으로 본 발명의 단백질 또는 상기 단

백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 본 발명의 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 본 발명의 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법을 제공한다. 상기에서 본 발명에 따른 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 영향을 준다는 것은 상기 단백질의 활성 또는 발현을 촉진시켜 식물의 뿌리 발달을 촉진시키고 장애물 접촉 스트레스 내성을 증가시키는 것을 말한다. 후보물질이 본 발명의 단백질 또는 유전자 발현에 미치는 영향은 당분야에 공지된 노던 블롯 분석 및 웨스턴 블롯 분석 등을 통해 측정할 수 있다. 본 발명의 단백질 활성 또는 유전자 발현에 영향을 주는 화합물로는, 예를 들면, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드 모조물, 화합물 및 생물체 등이 포함될 수 있다.

<63> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

<64> 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<65> <실시예 1>

<66> 대두(*Glycine max* cv *Paldal*) 뿌리에서 엑스판신 유전자의 클로닝

<67> 대두로부터 엑스판신 cDNAs를 분리하기 위해서 공지된 엑스판신 유전자들의

보존된 부위에 결합하는 프라이머를 제조하고 이를 이용하여 대두의 게노믹 DNA를 주형으로 PCR를 수행하였다. 먼저, 오이(*Cucumis*)의 엑스판신 유전자인 *CsEXP1* (Genbank accession 번호: U30382)와 *CsEXP2*(Genbank accession 번호: U30460), 애기장대(*Arabidopsis*)의 엑스판신 유전자 *AtEXP5*(Genbank accession 번호: U30478), 벼(*Oryza*)의 엑스판신 유전자 *OsEXP2*(Genbank accession 번호: U30477)와 *OsEXP3*(Genbank accession 번호: U30479), 토마토 (*Lycopersicon*)의 엑스판신 유전자 *LeEXP1*(Genbank accession 번호: U82123)의 보존된 공통적인 지역을 웹 사이트 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>)와 소프트웨어(Clustal V)를 사용하여 분석하였다. 상기 유전자들의 보존된 공통적인 지역을 PCR(Polymerase Chain Reaction)로 합성하기 위해 하기와 같은 정방향 및 역방향 프라이머를 제조하였다. 하기에서 Y는 T 또는 C, K는 T 또는 G, S는 C 또는 G, R은 A 또는 G를 의미한다.

<68> 정방향 프라이머(서열번호 3)

<69> 5'-NNGGATCCGAYGCNTCNGGNACNATGGGYGGYGCTGYGYTANGG-3'

<70> 역방향 프라이머(서열번호 4)

<71> 5'-NNGGATCCTTKSWYTGCCARTTNNSNCCCCARTTNCK-3'

<72> 대두의 게노믹 DNA를 주형으로 하고 상기 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 1x PCR 완충액, dNTP 200 μ m, 프라이머 1 μ m, MgCl₂ 1.5mM 및 *Taq* DNA

중합효소(Bioneer, Daejon, Korea) 2.5 units를 혼합하여 최종 반응액이 50 μ l가 되도록 하고 이를 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 2분간씩 35회 반복하여 수행하였다.

<73> 상기에서 증폭된 PCR 산물을 진클린 II 키트(BIO 101)를 이용하여 겔로부터 분리·정제한 후 생거법(Sanger method, the dideoxynucleotide chain termination method)(Sanger F. T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463, 1977)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 상기에서 증폭된 DNA 단편을 프라임-에이-진 시스템(Prime-a-Gene system, Promega, Madison, WI)을 이용하여 표지한 후 대두의 뿌리 cDNA 라이브러리인 Uni-ZAP XR 벡터(Stratagene, La Jolla, CA)에서 엑스판신 유전자를 검색하기 위한 탐침(probe)(서열번호 5)으로 사용하였다. 상기 탐침을 이용하여 공지된 방법으로 대두 뿌리의 cDNA 라이브러리(Uni-ZAP XR 벡터, Stratagene, La Jolla, CA)를 검색한 결과(Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989), 1개의 양성 클론을 분리하였다.

<74> <실시에 2>

<75> 대두 뿌리로부터 분리한 엑스판신 유전자 cDNA의 염기서열 결정 및 서열 상동성 조사

<76> 상기 실시예 1에서 분리한 클론의 염기서열을 생거법(Sanger method)을 이용한 키트(Sequenase version 2.0 kit, USB)를 이용하여 결정하였다. 결정된 DNA의 염기서열을 서열분석 프로그램(Mac DNASIS program, Hitachi Software Engineering, America Ltd., San Bruno. CA)으로 분석하여 상기 염기서열로부터 아미노산 서열을 유추하였다. 또한, 분석된 본 발명 유전자의 염기서열과 공지된 다른 종의 엑스판신 유전자의 염기서열과의 서열 상동성을 조사하였다.

<77> 실험 결과, 분리된 cDNA는 1089bp의 염기로 구성되어 있으며 N-말단에 신호 서열(signal sequence)로서 16개의 아미노산 서열을 포함하는 255개의 아미노산을 코딩하는 ORF(open reading frame)을 가지고 있었다. 또한, 본 발명의 유전자는 ??-엑스판신 족에 속하는 유전자인 담배의 *NtEXP3* (Link B. M. et al., *Plant Physiol.*, 118:907-916, 1998)과 86%, 오이(*Cucumis sativus*)의 *CsEXP2* (Shcherban T. Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92:9245-9249, 1995)와 92%, 벼의 *OsEXP1* (Cho H-T. et al., *Plant Cell*, 9:1661-1671, 1997b)과 85% 및 애기장대의 *AtEXP1* (Shcherban T. Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:9245-9249, 1995)과 82%의 서열 상동성을 나타냈다(도 1). 이에 본 발명자들은 대두의 뿌리로부터 새롭게 분리한 본 발명의 엑스판신 유전자를 *GmEXP1*로 명명하였다. 본 발명 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 나타낸 바와 같다. 또한, 본 발명자들은 본 발명의 *GmEXP1* 유전자의 염기서열을 진뱅크(Genbank accession 번호: AF516879)에 등록하였다.

<78> <실시예 3>

<79> 본 발명의 *GmEXP1* 유전자의 계통학적 분류

<80> α -엑스판신 속 유전자들과 강한 상동성을 나타내는 본 발명의 *GmEXP1* 유전자를 계통발생학적으로 분류하였다. 이를 위해 종래에 알려진 20개의 α -엑스판신과 본 발명의 엑스판신 유전자를 대상으로 하여 최대 가능성 방법(Maximum likelihood method)에 따라 PAUP 프로그램으로 계통수를 조사하였다. 공지된 엑스판신 유전자로는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 *AtEXP6*(Genbank accession 번호: U30480), *AtEXP1* (Genbank accession 번호: U30476), *AtEXP* (Genbank accession 번호: U30478), *AtEXP2*(Genbank accession 번호: U30481), 완두콩(*Pisum sativum*) 유래의 *PsEXP1* (Genbank accession 번호: X85187), 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 유래의 *LeEXP1* (Genbank accession 번호: U82123), *LeEXP18* (Genbank accession 번호: AJ004997), *LeEXP2* (Genbank accession 번호: AF096776), 담배(*Nicotiana tabacum*) 유래의 *NtEXP4* (Genbank accession 번호: AF049353), *NtEXP5*(Genbank accession 번호: AF049354), *NtEXP1*(Genbank accession 번호: AF049350), *NtEXP2* (Genbank accession 번호: AF049351), *NtEXP3* (Genbank accession 번호: AF049352), 미송(loblolly pine, *Pinus taeda*) 유래의 *PtEXP1* (Genbank accession 번호: U64892), 오이(*Cucumis sativus*) 유래의 *CsEXP2*(Genbank accession 번호: U30460), 벼(*Oryza sativa*) 유래의 *OsEXP1*(Genbank accession 번

호: Y07782), *OsEXP2* (U30477), *OsEXP3* (U30479), *OsEXP4* (Genbank accession 번호: U85246) 및 티모시 잔디 (*Phleum pratense*)로부터 유래된 *PHLP1* (Genbank accession 번호: X78813)을 사용하였다.

<81> 그 결과, 본 발명에 따른 *GmEXP1* 유전자는 α -엑스판신 아족(??-expansin subfamily)의 D 집단에 속함을 알 수 있었다(도 2).

<82> <실시예 4>

<83> 대두의 게놈 내에 존재하는 *GmEXP1* 유전자 분석

<84> *GmEXP1* 유전자가 실제로 대두 내에 존재하는지의 여부 및 수를 측정하기 위해 *GmEXP1* 유전자의 일부를 탐침으로 하여 게놈 서던 블롯을 수행하였다. 호글랜드 재배액(Hoagland solution)에서 26℃의 장일 조건(16시간 낮/8시간 밤)으로 20 일 간 재배한 대두의 잎으로부터 디엔이지 플랜트 미니 키트(DNeasy plant mini kit, QIAGEN²)를 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA 10 µg을 서로 다른 제한 효소 *EcoRV*, *HindIII* 및 *NcoI*로 자른 후 1% 아가로스 겔 상에서 분리하고 나일론막 (N⁺ nylon membrane)으로 이동시켰다. 이후 *GmEXP1*의 코딩영역을 포함하는 DNA 단편(*GmEXP1*의 52번부터 816번 핵산) 또는 *GmEXP1*의 코딩영역과 3' 미번역 영역을 포함하는 DNA 단편(*GmEXP1*의 603번부터 991번 핵산)을 탐침으로 하여 서던 블롯을 수

행하였다. 이때, 상기 탐침을 방사선 동위원소인 α - 32 P로 표지한 후 상기 게놈 DNA가 부착된 나일론 막과 65°C에서 혼성화 반응을 수행하였다(Ahn J. H. et al., *Plant Physiol.*, 116:671-679, 1998).

<85> 실험 결과, *GmEXP1*의 코딩영역만을 탐침으로 하여 혼성화 반응을 수행한 경우에는 여러 개의 밴드가 나타났다(도 3의 A). 이는 대두의 게놈 내에는 α -엑스판신과 상동성을 가지는 많은 종류의 엑스판신이 존재한다는 것을 의미한다. 한편, *GmEXP1*의 코딩영역과 3' 미번역 영역을 모두 포함하는 *GmEXP1* 유전자에만 특이적인 탐침으로 혼성화 반응을 수행한 경우에는 약한 밴드가 종종 나타나지만 강한 하나의 밴드가 나타남을 볼 수 있었다(도 3의 B). 따라서, *GmEXP1* 유전자는 대두 게놈에서 단일-카피(single-copy) 유전자로 존재함을 알 수 있었다.

<86> <실시예 5>

<87> 대두 조직의 종류에 따른 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴 조사

<88> 대두 조직의 종류에 따른 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 조사하였다. 먼저, 실시예 4와 동일한 조건으로 20일간 재배한 대두의 잎, 뿌리, 줄기 및 배축(hypocotyls)으로부터 총 RNA(total RNA)를 추출하고 상기 실시예 4의 *GmEXP1*에 특이적인 탐침으로 노던 블롯을 수행하였다. 각 조직으로부터 RNA는 알엔이지 플랜트 키트(RNeasy plant kit, QIAGEN[®])를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA 10 μ g을

1% 포름알데히드 아가로스 겔(formaldehyde agarose gel)상에서 분리한 다음 나일론 막으로 이동시키고, 상기 탐침과 65℃에서 혼성화 반응을 수행하였다.

<89> 실험 결과, 뿌리로부터 분리된 RNA에서만 혼성화 시그널이 나타났다(도 4). 이는 본 발명의 *GmEXP1* 유전자는 뿌리에 특이적으로 발현되며 뿌리발달과 관련되어 있음을 의미한다. 한편, *GmEXP1* mRNA의 크기는 상기 유전자의 cDNA 서열로부터 추정되는 것과 유사하게 약 1.1kb였다.

<90> <실시예 6>

<91> 대두 뿌리의 발달 단계에 따른 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴

<92> 대두 뿌리의 발달 단계에 따른 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 조사하였다. 대두 발아 후, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9일 및 13일 되었을 때 뿌리로부터 총 RNA를 추출하여 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 *GmEXP1* 유전자에 특이적인 탐침으로 노던 블롯을 수행하였다.

<93> 또한, 대두 뿌리의 성장패턴과 *GmEXP1* 유전자의 발현 패턴을 비교하였다. 대두 뿌리의 성장패턴은 액체 배지에서 자란 6개의 유식물의 1차 근과 2차 근 및 3차 근의 뿌리 길이를 측정함으로써 조사하였다. 유전자의 발현 패턴은 상기와 동일한 노던 블롯 방법으로 발아 후 5일된 유식물의 1차 근과 2차 근으로부터 RNA를 추출하여 분석하였다.

<94> 실험 결과, *GmEXP1* 유전자는 뿌리의 모든 발달 단계에서 발현됨을 확인할 수 있었다. 특히, 발아한지 1일된 유식물에서부터 높게 발현되었으며 발아 후 5일된 유식물에서 최대로 높게 발현되었다(도 5).

<95> 대두 뿌리의 성장패턴은 1차 근의 경우에 발아 후 4일부터 성장이 점점 늦어지는 것이 관찰된 반면, 2차 근은 발아 후 2일 된 1차 근에서부터 발아하기 시작하여 4일에서 6일 사이에 빠르게 성장함을 볼 수 있었다. 또한, 3차 근은 발아 후 8일에 나오기 시작하였다(도 6). 한편, 발아 후 5일된 유식물의 1차 근과 2차 근에서 *GmEXP1* 유전자는 모두 발현되었으나, 그 발현 수준은 1차 근에 비해 2차 근에서 매우 높게 나타났다(도 7). 이는 발아 후 5일된 유식물에서 1차 근의 성장은 늦어지고 2차 근의 성장은 빨라지기 때문이라 사료된다. 또한, *GmEXP1* 유전자의 발현은 2차 근의 성장과 함께 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서, 본 발명의 *GmEXP1* 유전자는 뿌리의 성장과 깊은 연관이 있으며, 뿌리 신장이 빠르게 일어날 때 *GmEXP1* 유전자 발현이 상향 조절됨을 알 수 있었다.

<96> <실시예 7>

<97> 대두 뿌리에서 *GmEXP1* 유전자의 공간적 발현 패턴

<98> 대두 뿌리에서 *GmEXP1* 유전자의 공간적 발현 패턴을 노던 블롯 및 조직내 유전자 혼성화법(in situ hybridization)으로 조사하였다. 이를 위해 *GmEXP1* 유전자

가 최대로 발현되는 발아 후 5일된 대두 유식물의 1차 근과 9일된 유식물의 2차 근에서 유전자의 발현을 조사하였다.

<99> 7-1) 노던 블롯

<100> 대두의 1차 근을 8개의 절편으로 절단하고(도 8의 A), 2차 근을 5개의 절편으로 절단하였다(도 8의 C). 각각의 절편으로부터 총 RNA를 분리하고 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 노던 블롯을 수행하였다.

<101> 실험 결과, 1차 근에서 *GmEXP1*는 세포 분열과 세포 신장에 관여하는(Ahn J. H. et al., *Plant Physiol.*, 116:671-679, 1998) 뿌리 말단 영역인 절편 1에서 높은 수준으로 발현되었다. 반면에 절편 2 내지 8 영역에서는 낮은 수준으로 발현됨을 관찰할 수 있었다(도 8의 B). 흥미롭게도 절편 6에서 *GmEXP1* 유전자의 발현이 약간 높은 수준으로 나타났는데, 이는 결뿌리인 2차 근이 자라기 시작하였기 때문이라 사료된다. 2차 근에서 *GmEXP1* 유전자의 발현은 1차 근과 동일하게 뿌리의 말단 부분을 포함하는 절편 1 영역에서 높은 수준으로 발현됨을 관찰할 수 있었다(도 8의 D). 따라서, 본 발명의 *GmEXP1* 유전자는 대두의 1차 근과 2차 근에서 세포분열과 신장이 일어나는 뿌리 말단 부분에서 높은 수준으로 발현됨을 알 수 있었다. 이로부터 본 발명의 유전자가 식물의 뿌리 발달 동안에 세포신장에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

<102> 7-2) 조직 내 유전자 혼성화(in situ hybridization)

<103> 조직 내 유전자 혼성화법으로 본 발명의 *GmEXP1* 유전자가 발현되는 영역을 조사하였다. 조직 내 유전자 혼성화법은 공지된 방법을 변형하여 5일된 대두의 1차 근을 이용하여 수행하였다(Glik B. R. et al., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, 179-205, 1993; Cho H-T. et al., *Plant J.* 15:805-812, 1998). 대두의 1차 근을 에탄올 50%(v/v), 아세트산 5%(v/v), 포르말데히드 3.7%(v/v)를 포함하는 포르말데히드-아세트산 고정액에서 고정시킨 후 파라핀으로 포매(embedding)시켰다. 상기 포매된 뿌리 조직을 마이크로톰(Leica Instruments GmbH, Wetzlar, Germany)을 이용하여 8 μ m 두께로 세로 또는 가로로 절단하여 절편을 제조하였다. 상기 뿌리 조직을 횡단으로 자르는 경우에는 뿌리 부분의 해부학적 형태를 바탕으로 세포 분열대, 신장대, 성숙대를 선택하여 절편을 제조하였다. 탐침으로는 상기 실시예 4의 *GmEXP1*-특이적인 DNA 단편을 주형으로 DIG-표지된 RNA 탐침(안티센스 방향: 서열번호 6 또는 센스 방향: 서열번호 7)을 합성하여 사용하였다. 즉, 실시예 4의 *GmEXP1*-특이적인 DNA 단편을 *Bam*H I과 *Hind* III로 절단하고 이를 pSTP18 벡터(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)에 삽입시켰다. 상기 플라스미드를 주형으로 SP6 또는 T7 중합효소(polymerase)를 이용하여 RNAs를 제조하였다. 상기 RNAs는 UTP에 디고옥시제닌(digoxi genin)이 결합된 형태로 되어 있다. 이때, 센스 방향 RNA 탐침은 대조군으로 사용하였다. 상기에

서 합성한 DIG-표지된 RNA 탐침과 상기 대두 뿌리 조직 단편을 65℃에서 혼성화시켰다. 이를 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase)가 표지된 디고옥시제닌에 특이적으로 반응하는 1차 DIG 항체(Boehringer Mannheim)와 반응시켰다. 반응이 완료되면, 니트로블루 테트라졸리움/5-브로모-4-클로로-3-인돌일포스페이트(nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)로 염색하여 현미경(Optiphot-2, Nikon, Tokyo)으로 관찰하였다.

<104> 실험 결과, 상기 실시예 7-1)의 RNA 게놈 겔 블롯의 결과와 동일하게 대두의 1차 근의 말단에서 *GmEXP1* 유전자가 높은 수준으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 대두의 1차 근을 세로로 절단한 절편을 안티센스 RNA 탐침으로 혼성화한 경우, *GmEXP1* 유전자의 발현은 세포 분열대에서 신장대로 가면서 점차적으로 증가하며 성숙대에서는 감소하는 것을 볼 수 있었으며(도 9의 A), 센스 RNA 탐침으로 혼성화한 경우에는 유전자의 발현을 검출 할 수 없었다(도 9의 B). 상기 안티센스 RNA 탐침으로 혼성화한 1차 근의 신장대 부분을 확대하여 관찰한 결과, *GmEXP1* 유전자가 신장대의 상피세포(epidermis), 내부세포층(underlying cell layers) 및 관다발(vascular cylinder) 세포에서 발현됨을 관찰할 수 있었다(도 9의 C). 또한, 대두의 1차 근을 가로로 절단한 절편의 경우, 근관(root cap)에 있는 세포에서는 *GmEXP1* 유전자가 낮은 수준으로 발현되며(도 10의 A), 신장대에서는 상피세포와 관다발세포에서 높은 수준으로 발현됨을 관찰할 수 있었다(도 10의 B 및 C). 그러나, *GmEXP1* 유전자는 성숙대에 있는 상피세포에서는 낮은 수준으로 발현되었다(도 10의 D). 따라서, 본 발명의 *GmEXP1* 유전자는 세포 분열대와 신장대에서 발현

되며 특히 상피세포와 내부세포층에서 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다.

<105> <실시예 8>

<106> 본 발명의 *GmEXPI* 유전자의 발현과 대두의 뿌리 형성의 시작과의 관련성 조사

<107> 본 발명의 *GmEXPI* 유전자의 발현이 대두에서 뿌리 형성의 시작과 관련성이 있는지를 조사하기 위해 대두의 2차 근이 발생되기 시작할 때 *GmEXPI* 유전자의 발현 패턴을 조사하였다. 대두의 5일된 유식물의 1차 근에서 2차 근이 시작하는 지점인 뿌리 말단에서 약 3.5cm의 지점을 세로 또는 가로로 절단하여 절편을 제조하였다. 이를 상기 실시예 7-2)와 동일한 방법으로 센스 RNA 탐침과 안티센스 RNA 탐침을 이용하여 조직 내 유전자 혼성화를 수행하였다.

<108> 실험 결과, 대두의 뿌리를 세로로 절단하여 안티센스 RNA 탐침과 혼성화한 경우에 *GmEXPI* 유전자는 2차 근이 시작하는 부분의 상피세포에서 특이적으로 발현되는 것을 볼 수 있었다(도 11의 A). 대두의 뿌리를 가로로 절단하여 안티센스 RNA 탐침과 혼성화한 경우에 *GmEXPI* 유전자는 새로 생겨난 2차 근의 말단 부분에서 주로 발현되는 것을 볼 수 있었다(도 11의 B). 반면, 센스 RNA 탐침으로 동일한 절편을 혼성화한 경우에는 *GmEXPI* 유전자의 발현을 검출할 수 없었다(도 11의 C). 식물체의 2차 근은 1차 근의 성숙대 내의 내피(pericycle)에서 시작하여 1차 근이 생성된피층조직(cortex)과 외피(epidermis)의 세포층을 통과하는 것으로 알려져 있

다(Malamy J. E. et al., *Development*, 124:33-44, 1997). 이로부터 2차 근과 1차 근의 발생과정은 다르지만 세포확장(cell expansion)을 위하여 동일한 *GmEXP1* 유전자를 필요로 하며, 형태학적, 유기체학적 및 유전자 발현의 측면에서 서로 유의적인 차이가 없다는 것을 알 수 있었다(Dolan L. et al., *Development*, 119:71-84, 1993).

<109> <실시예 9>

<110> *GmEXP1* 유전자로 형질전환된 담배 뿌리의 산성 환경에서의 반응과 장애물 저항 능력의 변화 조사

<111> 9-1) 담배의 형질전환

<112> 식물에서 본 발명의 *GmEXP1* 유전자의 기능을 확인하기 위하여 담배에서 본 발명의 *GmEXP1* 유전자를 과다 발현시켰다. 이를 위해 본 발명의 *GmEXP1* 유전자의 cDNA의 코딩영역(765bp)을 증폭하기 위해 하기와 같은 한쌍의 프라이머를 공지의 방법으로 제조하였다.

<113> 정방향 프라이머(서열번호 8)

<114> 5'-ACCAAGCTTCAACCTCTCATCATTAGGC-3'

<115> 역방향 프라이머(서열번호 9)

<116> 5'-ACCAAGCTTGGAGTTGATGGGAATAATCA-3'

<117> 대두의 cDNAs 라이브러리(Uni-ZAP XR 벡터)를 주형으로 상기 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 *Hind*III로 절단한 다음 CaMV 35S 프로모터와 NOS 터미네이터를 포함하는 pGA643 벡터(An G. et al., *Binary vectors*. Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, A31-A319)의 *Hind*III부위에 삽입하였다. 상기 벡터를 전기천공법으로 아그로박테리움 튜마파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 도입시킨 후 이를 이용하여 공지된 방법으로 담배를 형질 전환하였다(Holsters M. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 163:181-187, 1978; Horsch R. B. et al., *Science*, 227:1229-1231, 1985). 상기 형질 전환된 담배를 200mg/L의 카나마이신(kanamycin)과 500mg/L의 카르베니실린(carbenicillin)이 포함된 MS 기본 배지(Murashige and Skoog basal medium, Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하여 선별하였다.

<118> 9-2) 형질 전환된 담배의 표현형의 변화 조사

<119> 상기 실시예 9-1)의 형질 전환된 담배의 표현형의 변화를 야생형과 비교하여 조사하였다. 또한, *GmEXP1* 유전자가 과다발현된 형질전환체를 상기 7-2)와 동일한

방법으로 절편을 제조하고, 이의 해부학적 특성을 현미경으로 관찰하였다.

<120>

실험 결과, *GmEXP1* 유전자가 과다발현된 형질전환체는 야생형에 비해 그 크기가 상대적으로 큰 것으로 나타났다. 이로부터 *GmEXP1* 유전자의 과다발현이 식물의 성장을 촉진함을 알 수 있었다. 또한, 형질전환체의 경우에 잎, 줄기 및 꽃에서 비정상적인 표현형이 관찰되었다. *GmEXP1* 유전자가 높은 수준으로 발현되는 라인의 경우에는 많은 잎들이 정단(shoot apex)으로부터 동시에 발달하여 잎이 우거진 형태의 표현형을 나타내었다. 반면, *GmEXP1* 유전자가 낮은 수준으로 발현되는 라인의 경우에는 약한 정단 우성(apical dominance)으로 인하여 많은 옆 줄기(axillary shoot)들이 형성되는 표현형을 나타내었다(결과 미도시). 해부학적인 특성으로는 *GmEXP1* 유전자가 높은 수준으로 발현되는 라인의 경우에 잎의 세포가 커지고 불규칙적으로 층을 이루는 것이 관찰되었다(도 12의 A 및 B). 또한, 형질전환체의 줄기 물관 세포(xylem cell)는 야생형에 비해 두꺼워진 것을 관찰할 수 있었으나(도 12의 C 및 D), 잎자루(petioles)의 물관세포는 야생형과 차이가 나타나지 않았다(도 12의 E 및 F). 또한, 형질전환체의 뿌리 말단부분이 야생형에 비해 좀더 신장되어 있음을 관찰할 수 있었다(도 13). 이러한 결과로부터 *GmEXP1* 유전자의 과다발현은 식물체의 성장을 촉진하며 형질전환체의 발달 과정에 선택적으로 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

<121>

9-3) 형질전환된 담배의 산성 환경에서 성장 정도 및 장애물 접촉 스트레스(Obstacle-Touching Stress)에 대한 반응성 조사

<122> 형질전환된 담배 뿌리의 산성 환경에서의 성장 정도를 조사하기 위하여, *GmEXP1* 유전자를 높은 수준으로 발현하는 형질전환체는 불임이기 때문에 *GmEXP1* 유전자를 낮은 수준으로 발현하는 형질전환체를 자가수정하고 T₂ 세대에서 동형접합자의 종자를 수득하였다. 상기 T₂ 종자들을 10% 블리치(bleach) 용액으로 10분간 표면 살균한 후 멸균수로 수회 세척하였다. 상기 종자를 0.5 X MS 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 포함하며 pH가 각각 4.5 또는 7.0으로 조절된 1.5%(w/v) 아가 플레이트에 파종하였다. 이때 대조군으로 야생형 대두의 종자를 동일한 방법으로 아가 플레이트에 파종하였다. 동일한 시기에서 발아시키기 위해 상기 플레이트를 춘화 처리한 후(암조건에서 2일간 저온 처리) 각각의 플레이트를 수직으로 세워 26??로 장일 조건(16시간 낮/8시간 밤) 하에서 성장시켰다. 발아 후 17일에 식물체의 1차 근의 길이를 측정하였다.

<123> 실험 결과, 형질전환체의 뿌리 길이는 중성 및 산성 환경 하에서 배양된 야생형의 뿌리 길이에 비해 긴 것으로 관찰되었다. 특히, 형질전환체의 뿌리 길이는 중성 환경에 비해 산성 환경에서 더 긴 것으로 관찰되었다(도 14). 식물에서 산성 환경은 식물 조직의 신장을 촉진시킨다고 알려져 있다. 본 발명의 형질전환체는 엑스판신 유전자가 과다발현되어 야생형에 비해 산성 환경에 대해 더 잘 반응함으로써 뿌리 길이가 더 긴 것으로 생각되었다. 따라서, 본 발명의 *GmEXP1* 유전자가 대두에서 산성 성장을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

<124> 더불어, 형질전환된 담배 뿌리의 장애물 저항 능력을 조사하기 위하여, 상기 T2 종자와 야생형 종자를 상기와 동일한 방법으로 표면 살균한 후 MS 배지가 포함된 pH 4.5의 아가 플레이트에 파종하였다. 이를 2일간 춘화처리 한 후 플레이트를 수직으로 세웠다. 3일 후 이들 중에서 반은 수직으로 계속 놓아두고 나머지 반은 장애물 스트레스를 주기 위해 45℃로 기울여 놓았다. 이를 26℃에서 장일 조건(16시간 낮/8시간 밤)하에서 성장시켰다. 발아 후 17일에 식물체의 1차 근의 길이를 측정하였다.

<125> 실험 결과, 장애물 접촉 스트레스를 주지 않은 야생형 대두의 1차 근은 아래를 향하여 일직선으로 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 한편, 장애물 접촉 스트레스를 가한 야생형 대두의 1차 근의 뿌리 길이가 줄어드는 것으로 나타났다. 즉, 야생형 대두에 장애물 접촉 스트레스를 가하지 않은 경우에 평균 뿌리 길이가 3.5cm였으나 장애물 접촉 스트레스를 가한 경우에 평균 뿌리 길이가 1.1cm로 줄어들었다. 그러나, *GmEXP1* 유전자를 과다 발현하는 형질전환체의 1차 근은 장애물 접촉 스트레스의 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났으며, 야생형에 비해 1차 근의 길이가 긴 것으로 나타났다(도 15). 이러한 결과로부터 *GmEXP1* 유전자의 과다 발현이 장애물 접촉 스트레스에 대한 내성을 부여한다는 사실을 확인할 수 있었다. 따라서, 식물체가 토양에서 성장할 때 받는 스트레스를 극복하는데 있어서 *GmEXP1* 유전자가 중요한 역할을 수행한다는 것을 알 수 있었다.

<126> 9-4) 형질전환체 뿌리의 상피 세포 길이 조사

<127> 상기 실시예 9-3)과 동일한 방법으로 야생형 대두와 형질전환된 대두를 1.5%(w/v) 아가 플레이트(pH 4.5)에 파종한 후 45℃로 기울여 장애물 접촉 스트레스를 주었다. 이를 26℃에서 장일 조건(16시간 낮/8시간 밤)하에서 성장시켰다. 발아 후 17일에 식물체의 뿌리와 줄기의 상피세포 길이를 측정하였다. 상피세포 길이는 NIH 이미지 소프트웨어(United States National Institutes of Health and available, <http://rsb.info.nih.gov/nihimage>)를 사용하여 측정하였다.

<128> 실험 결과, *GmEXP1* 유전자가 과다발현되는 형질전환체의 뿌리 상피 세포가 야생형에 비해 신장되어 있었으며(표 1), 이것이 형질전환체가 빠른 성장을 보이는 주요한 원인일 것으로 생각된다. 그러나, 형질전환체의 줄기와 관다발의 상피세포 길이는 야생형과 차이가 나타나지 않았다(결과 미도시).

【표 1】

<129> 야생형 대두와 형질 전환체의 뿌리 상피세포 길이

뿌리 말단으로부터의 거리(μm)	세포길이(μm)	
	야생형 대두	형질전환된 대두
400	17.6±3.9	30.2±6.9
800	32.0±5.0	71.9±15.7
1,200	140.5±21.6	216.0±25.5
1,600	188.7±33.7	207.9±30.7

【발명의 효과】

<130> 본 발명에서 분리된 *GmEXP1* 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 엑스판신 단백질은 식물의 뿌리 발달과 관련된 형질의 개선 및 타 식물체에서 뿌리 발달 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용 될 수 있다. 또한, 본 발명의 유전자를 이용하여 식물체의 뿌리 발달을 촉진시키고 식물체에 장애물 접촉 스트레스 내성을 부여할 수 있는 효과가 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 식물의 뿌리 발달 조절 단백질.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 대두(*Glycine max*)로부터 분리된 것을 특징으로 하는 단백질.

【청구항 3】

제1항의 단백질을 암호화하는 유전자.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 뿌리-특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 유전자.

【청구항 5】

제3항 또는 제4항에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 *GmEXP1* 유전자.

【청구항 6】

제3항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 7】

제8항에 있어서, 제5항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pGA643/*GmEXP1*.

【청구항 8】

제6항의 재조합 벡터로 형질전환된 박테리아.

【청구항 9】

제3항의 유전자를 식물 발현 벡터에 삽입한 후 이를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 뿌리 발달을 촉진하는 방법.

【청구항 10】

제3항의 유전자를 식물 발현 벡터에 삽입한 후, 이를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 장애물-접촉 스트레스(obstacle-touching stress)에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 방법.

【청구항 11】

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물인 방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 단자엽 식물이 벼, 밀, 보리, 죽순, 옥수수, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마 및 생강 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제11항에 있어서, 상기 쌍자엽 식물이 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쪽갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제1항의 단백질 또는 제1항의 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 상기 단백질의 활성 또는 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 제1항의 단백질의 활성 또는 발현에 영향을 주는 화합물을 동

정하는 방법.

【청구항 15】

제14항에 있어서, 상기 화합물이 제1항의 단백질 활성 또는 발현을 촉진함을 특징으로 하는 방법.

【도면】

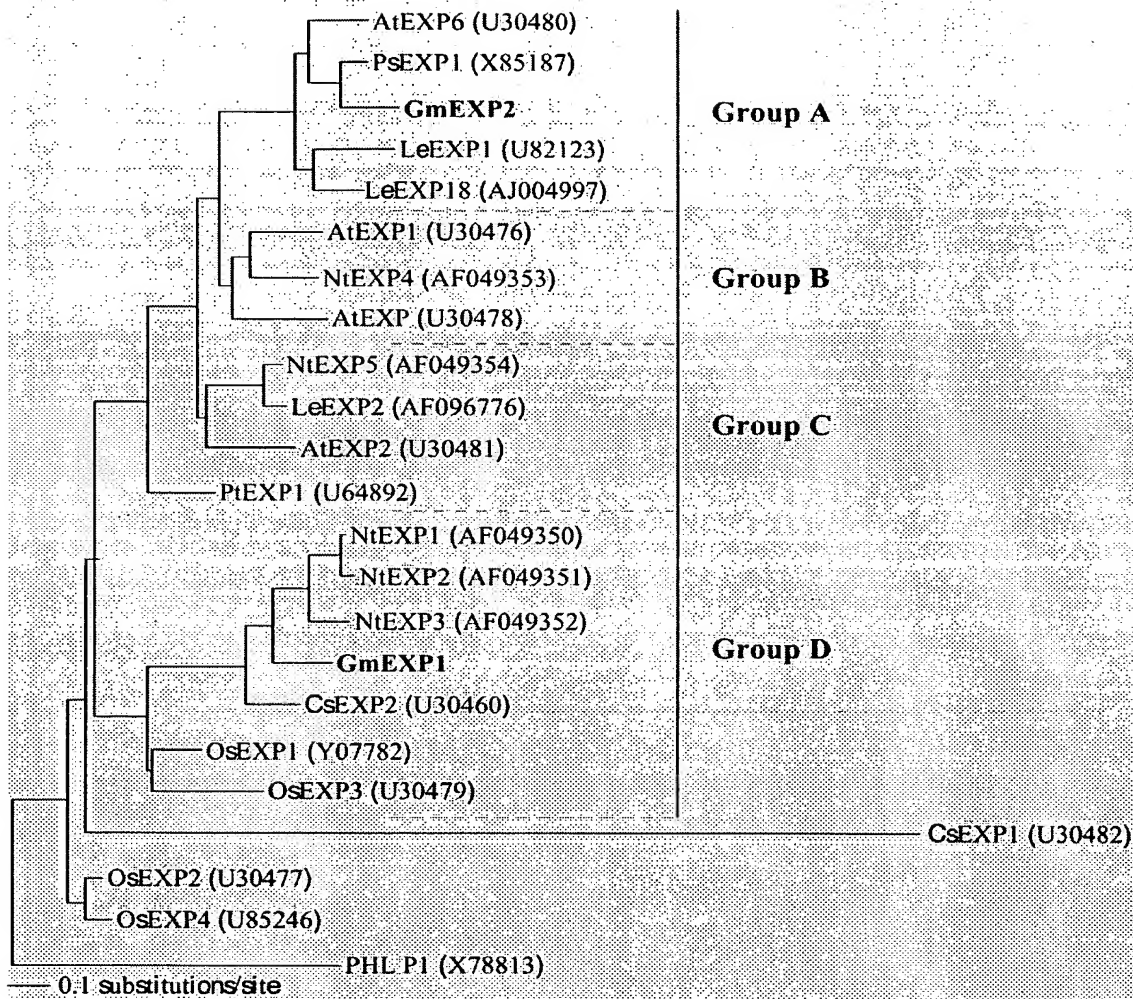
【도 1】

```

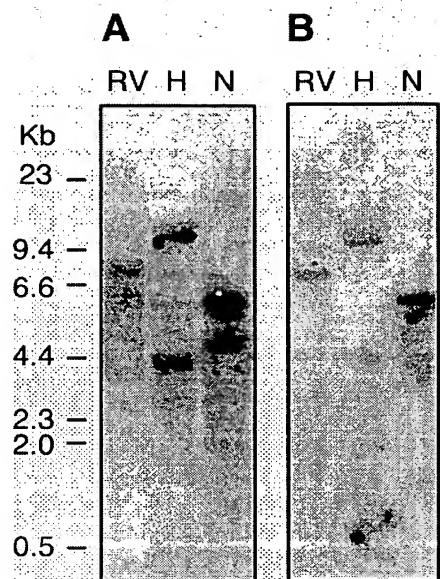
GmEXP1 MGK-IMLVLGSLIGLCCFTIT--TYA-----FSPSGWTNAHATFYGGSD
NtEXP3 MAKCGILALGFIIGF--FSIFFNANA-----FTASGWMRAHATFYGGAD
CsEXP2 MEK-LPFAPFAFFLALSNNFFLF-VNA-----FTASGWAPAHATFYGESD
AtEXP6 MA-----MLGLVLSVSVLTILALSEARIPGVYNGGGWETAHATFYGGSD
PsEXP1 MA-----AI-LLLTIASLTSLFAPTARIPGVYTGGPWTSAHATFYGGSD
* . . . . . * * * * * *
GmEXP1 ASGTMGGACGYGNLYATGYGTRTAALSTALFNDGASCGQCYKIICDYKSD
NtEXP3 ASGTMGGACGYGNLYSTGYGTRSAALSTALFNSGGSCGQCYKIICDFYAE
CsEXP2 ASGTMGGACGYGNLYQTGYGTRTAALSTALFNDGASCGQCFKIICDYKTD
AtEXP6 ASGTMGGACGYGNLYSQGYGVNTAALSTALFNNGFSCGACFELKCA--SD
PsEXP1 ASGTMGGACGYGNLYSQGYGVNTAALSTALFNNGLSGACFELKCD--QD
* * * * * * * * * * *
GmEXP1 SRWCIKGR-SVTVTATNFCPPNFALPNNNGGWCNPPLKHFDMAQPAWEKI
NtEXP3 PRWCKKGV-SVTITATNFCPPNYALPSDNGGWCNPPRQHFDMAQPAWEKI
CsEXP2 PRWCIKGA-SVTITATNFCPPNYALPNNNGGWCNPPLKHFDMAQPAWQKI
AtEXP6 PKWCHSGSPSIFITATNFCPPNFAQPSDNGGWCNPPRPHFDLAMPMLFKI
PsEXP1 PRWCNPGNPSILITATNFCPPNFAEPSDNGGWCNPPRPHFDLAMPMLFKI
. . * * * * * * * * * * *
GmEXP1 GIYRGGIIPVLFQRPVPCCKKHGGVRFVSNGRDYFELVLISNVGGAGSIQSV
NtEXP3 GVYRGGIIPVFYQRPVPCCKKRGGVRFTINGRDYFELVLVSNVGGAGSVRSV
CsEXP2 GIYRGGIIPVLYQRPVPCCKKRGGVRFTVNGRDYFELVLITNVGGAGDIKSV
AtEXP6 AEYRAGIVPVSFRRVPCRKRGGIRFTINGFRYFNLVLVTNVAGAGNIVRL
PsEXP1 AQYRAGIVPVAYRRVPCRKAGGIRFTINGFRYFNLVLITNVAGAGDIVRV
. * * * * * * * * * * *
GmEXP1 FIKGSKTG-WMAMSRNWGSNWQSNAYLNGQSLSFRTTDDGETRVFQDIV
NtEXP3 QIKGSRT-NWMTMSNNGWGANFQSNLYLNGQSLSFRTTDDGVTKTFLNIV
CsEXP2 SIKGSKSSNWTTPMSRNWGANWQSNLYLNGQSLSFKVTTSDGQVQVFNNAV
AtEXP6 GVKGTHTS-WMTMSRNWQONWQSNVSVLVGQSLSFRTSSDRRSSTSWNIA
PsEXP1 SVKGTNTA-WMTMSRNWQONWQSNVAVFVGQALSFRVTGSDRRTSTSWNVA
* . . . . * * * * * * *
GmEXP1 PVSWTFGQTFSSPVQF-
NtEXP3 PANWRFQQTFSSPTQFS
CsEXP2 PSSWRFQQTFASKVQFS
AtEXP6 PANWKFGQTFMGKNFRV
PsEXP1 PPHWQFGQTFMGKNFRV
* * * * *

```

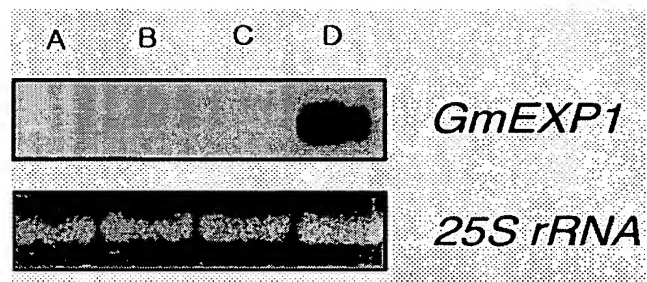
【도 2】



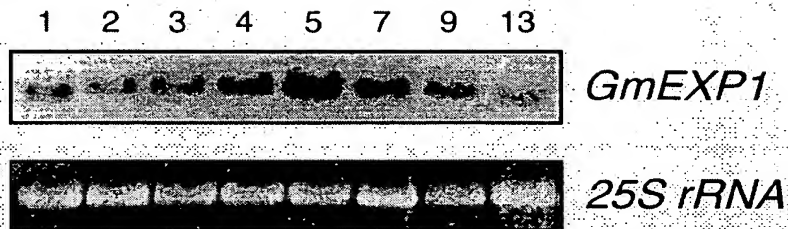
【図 3】



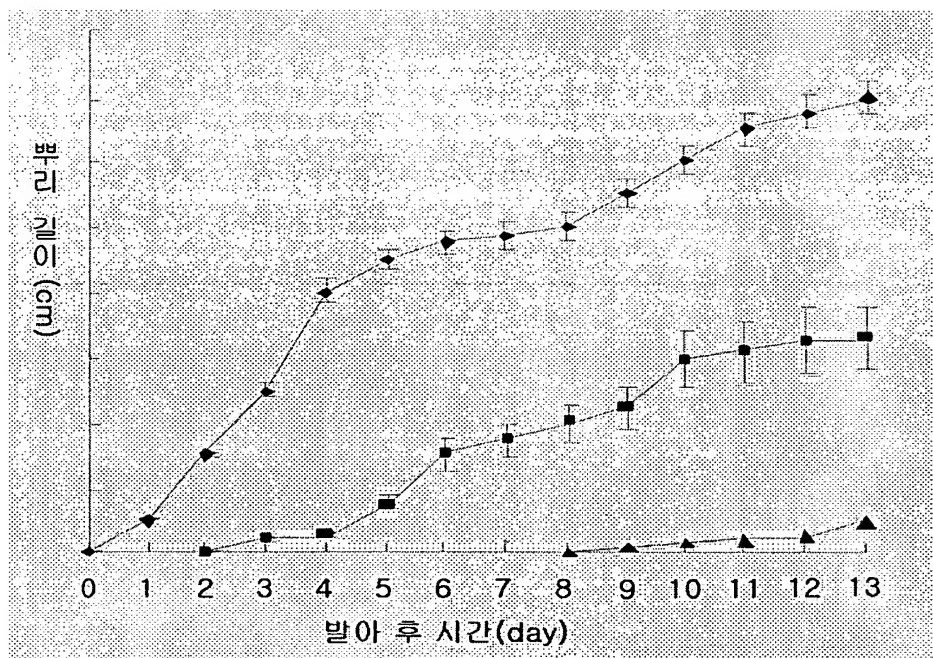
【図 4】



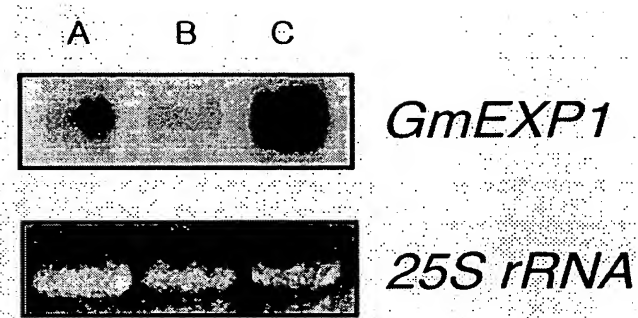
【도 5】



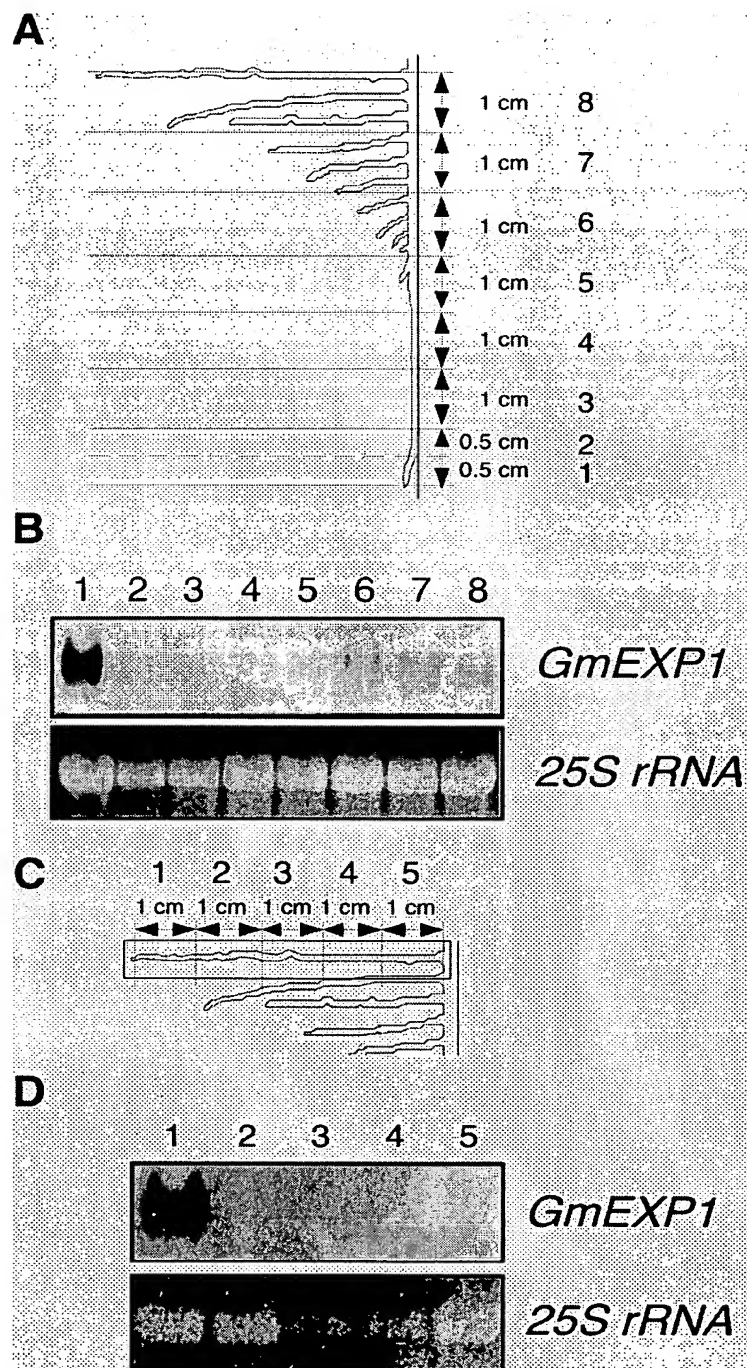
【도 6】



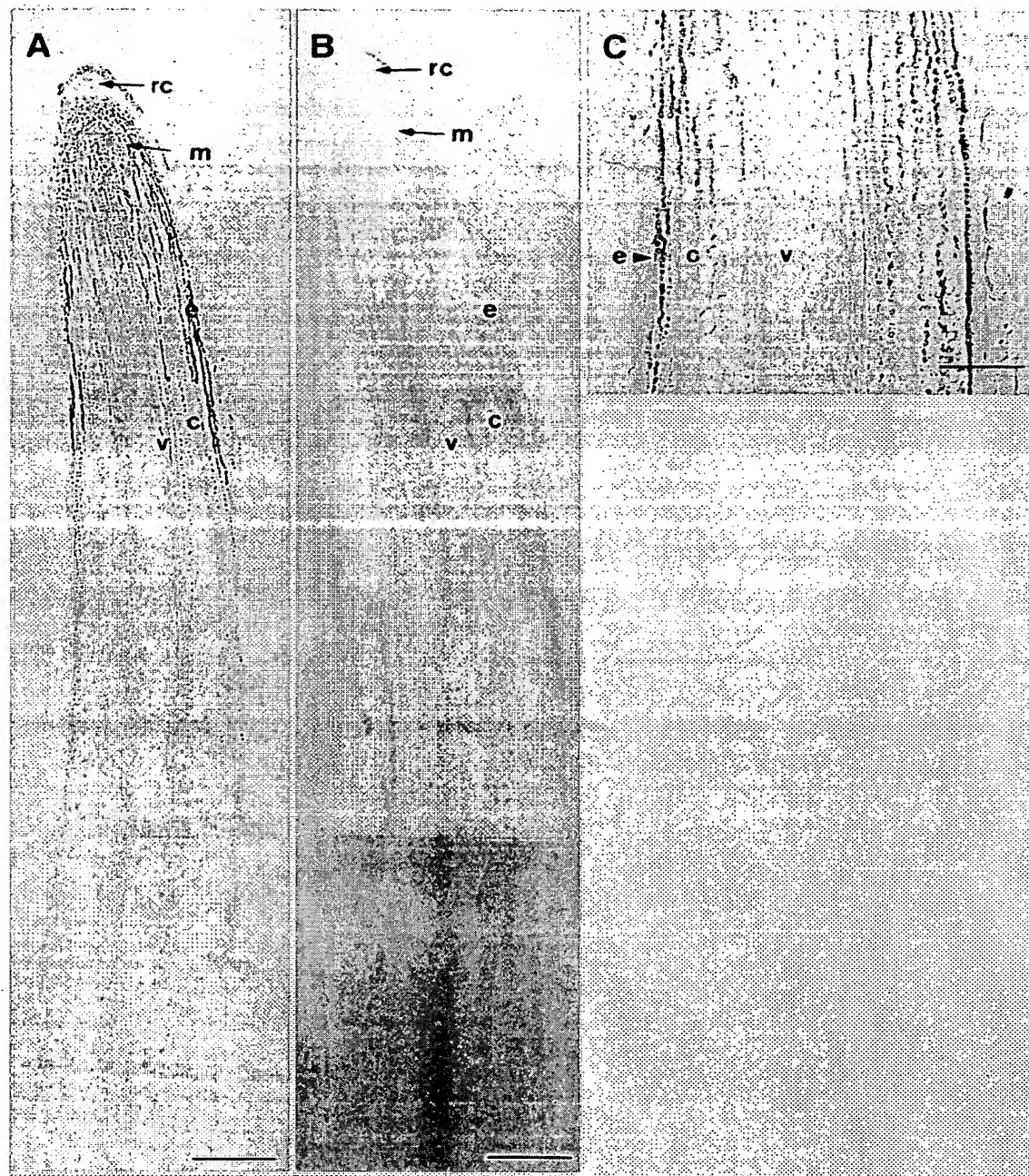
【도 7】



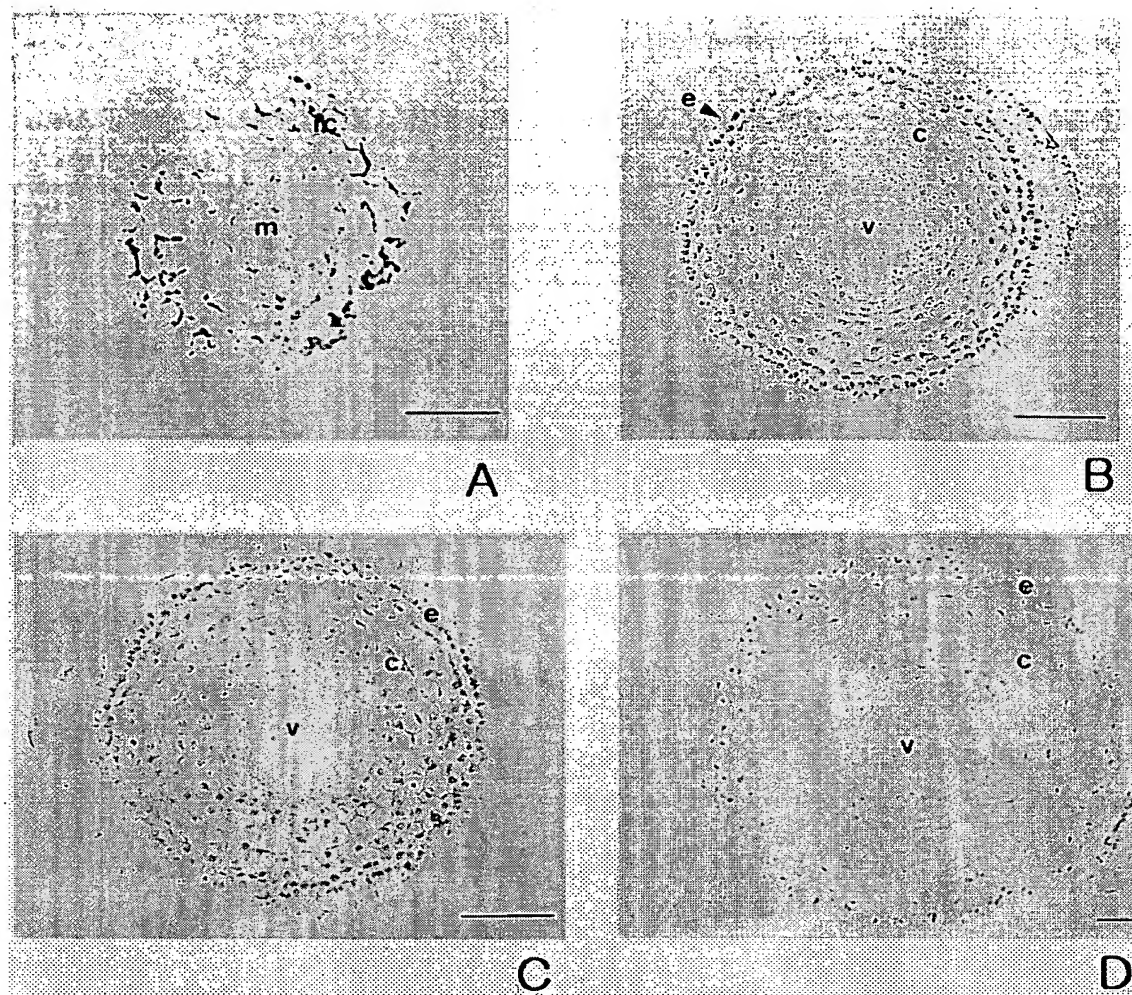
【도 8】



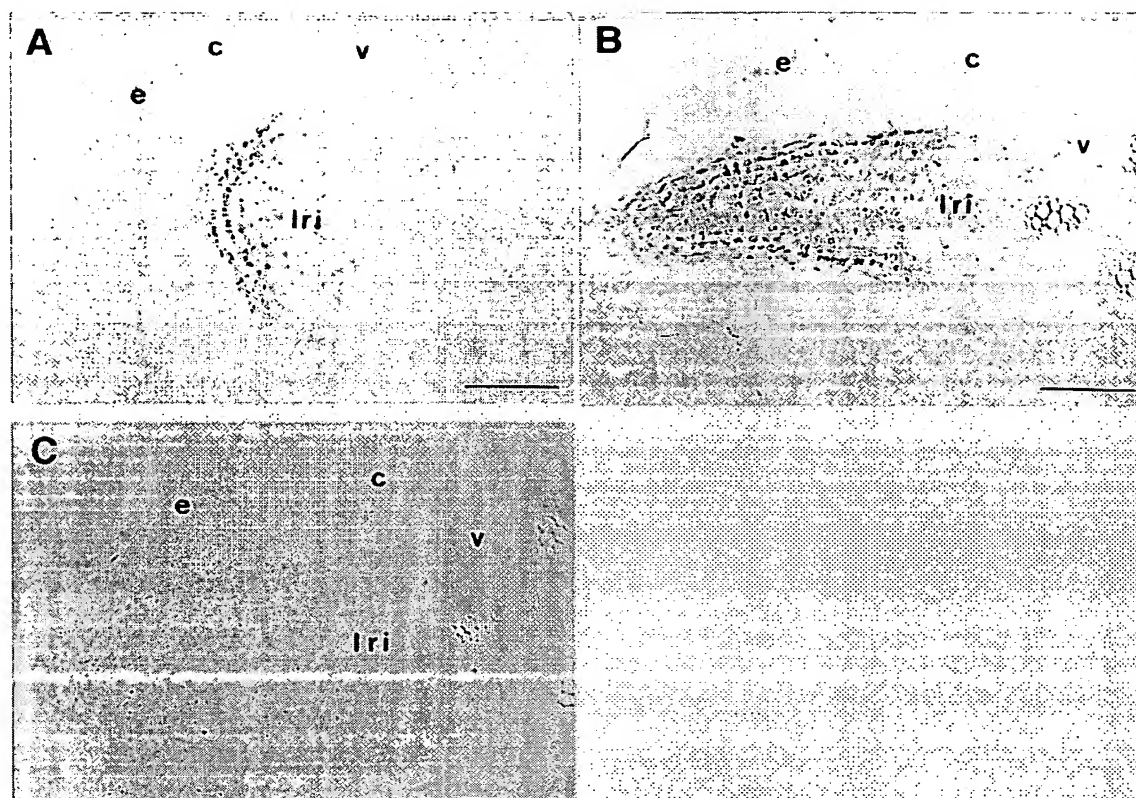
【도 9】



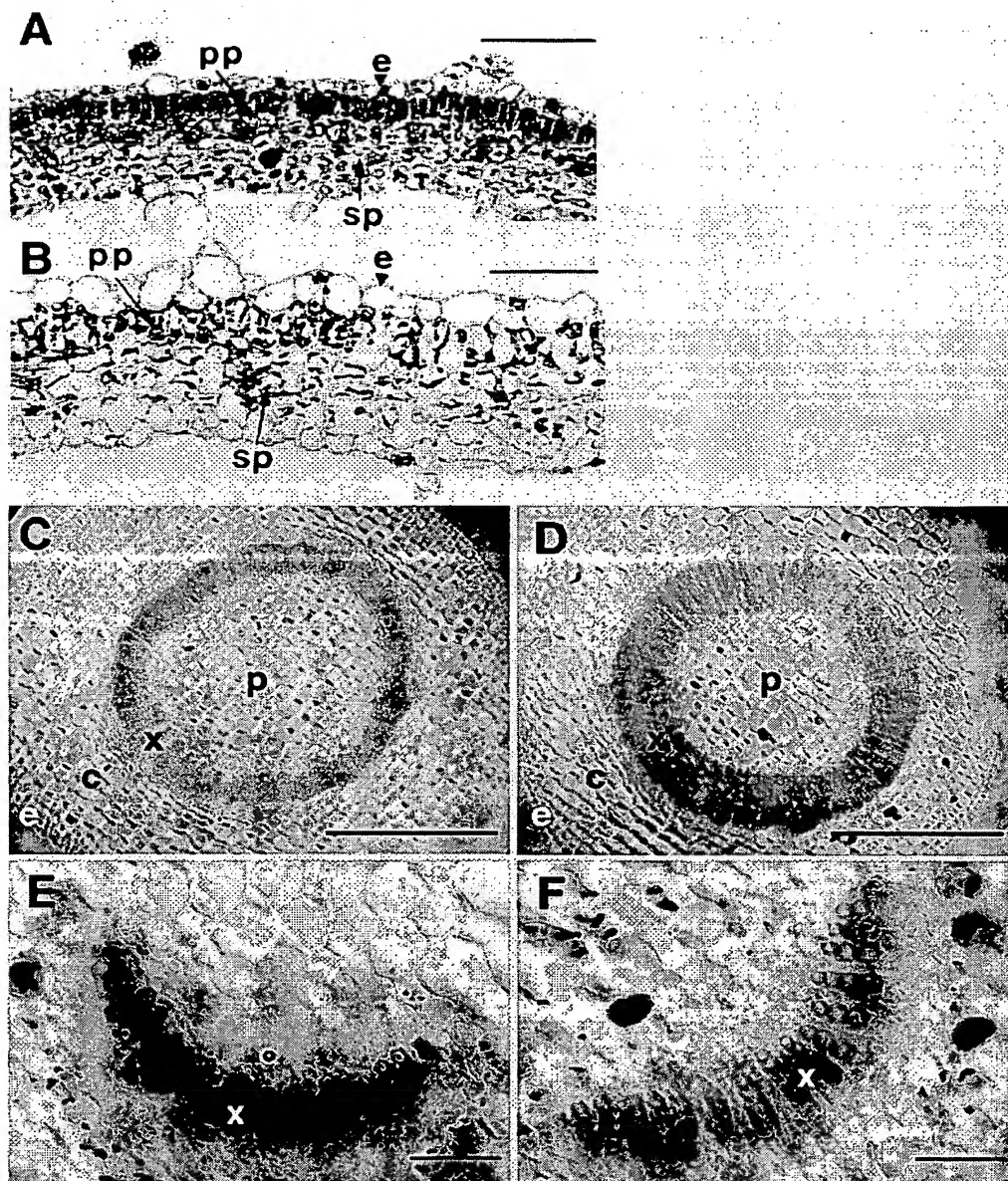
【図 10】



【図 11】



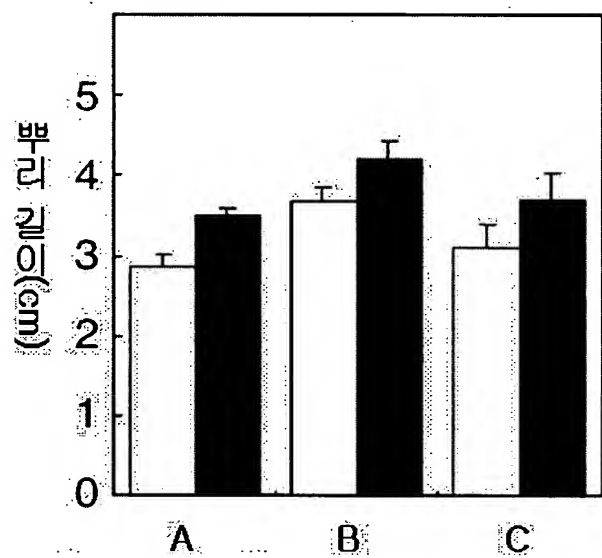
【図 12】



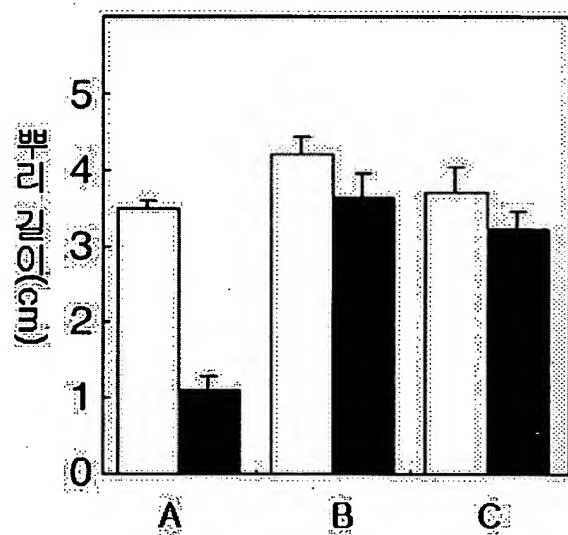
【도 13】



【도 14】



【도 15】



【서열목록】

- <110> Seoul National University in Korea
 <120> Gene controlling root development of plants and method for
 manipulating root development of plant using the same
 <160> 9
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 1089
 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <220><221> CDS
 <222> (52)..(816)
 <223> Glycine max expansin(GmEXP1)
 <400> 1

```

gcacgagctt caacctctca tcattaggca ttcagcaagc aagaaaaaa a          51
atg ggc aaa atc atg ctt gtt ttg ggt agc ctc att gga tta tgc tgt          99
Met Gly Lys Ile Met Leu Val Leu Gly Ser Leu Ile Gly Leu Cys Cys
      1             5             10             15
ttc aca atc act acc tat gcc ttc tca cct tct gga tgg acc aac gcc          147
Phe Thr Ile Thr Thr Tyr Ala Phe Ser Pro Ser Gly Trp Thr Asn Ala
      20             25             30
cat gcc act ttt tat ggg ggt agt gat gct tca gga act atg ggg gga          195
His Ala Thr Phe Tyr Gly Gly Ser Asp Ala Ser Gly Thr Met Gly Gly
      35             40             45
gct tgt ggg tat ggg aat ctg tat gca act ggg tat gga act aga act          243
Ala Cys Gly Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Thr Gly Tyr Gly Thr Arg Thr
      50             55             60
gca gct tta agc act gcc tta ttt aat gat gga gct tcc tgt ggt cag          291
Ala Ala Leu Ser Thr Ala Leu Phe Asn Asp Gly Ala Ser Cys Gly Gln
      65             70             75             80
tgc tac aaa att ata tgt gat tac aaa tca gac tct aga tgg tgc atc          339
Cys Tyr Lys Ile Ile Cys Asp Tyr Lys Ser Asp Ser Arg Trp Cys Ile
      85             90             95
aaa gga aga tct gta acc gta act gcc aca aac ttt tgc cct ccc aat          387
Lys Gly Arg Ser Val Thr Val Thr Ala Thr Asn Phe Cys Pro Pro Asn
      100            105            110

```

ttc gcc ctt cct aac aac aat gga ggc tgg tgc aac cca cca ctc aag 435
 Phe Ala Leu Pro Asn Asn Asn Gly Gly Trp Cys Asn Pro Pro Leu Lys
 115 120 125
 cat ttt gat atg gcc caa ccc gct tgg gaa aag att ggt att tac aga 483
 His Phe Asp Met Ala Gln Pro Ala Trp Glu Lys Ile Gly Ile Tyr Arg
 130 135 140
 gga ggg atc gtc ccc gtg cta ttt caa agg gtt cca tgc aaa aag cat 531
 Gly Gly Ile Val Pro Val Leu Phe Gln Arg Val Pro Cys Lys Lys His
 145 150 155 160
 gga ggg gtt agg ttc agt gtg aat ggg agg gac tac ttt gag cta gta 579
 Gly Gly Val Arg Phe Ser Val Asn Gly Arg Asp Tyr Phe Glu Leu Val
 165 170 175
 ttg atc agc aat gtg ggg ggt gct gga tcc atc caa tca gtg ttc att 627
 Leu Ile Ser Asn Val Gly Gly Ala Gly Ser Ile Gln Ser Val Phe Ile
 180 185 190
 aaa ggc tca aaa act gga tgg atg gca atg tca aga aat tgg ggt tct 675
 Lys Gly Ser Lys Thr Gly Trp Met Ala Met Ser Arg Asn Trp Gly Ser
 195 200 205
 aat tgg caa tcc aat gcg tat ttg aat ggt caa tct ttg tcc ttc agg 723
 Asn Trp Gln Ser Asn Ala Tyr Leu Asn Gly Gln Ser Leu Ser Phe Arg
 210 215 220
 gtc acc acc act gat gga gag acc aga gtt ttc caa gat att gtt cca 771
 Val Thr Thr Thr Asp Gly Glu Thr Arg Val Phe Gln Asp Ile Val Pro
 225 230 235 240
 gta agt tgg aca ttc ggc caa act ttc tct agc cca gtt cag ttc taag 820
 Val Ser Trp Thr Phe Gly Gln Thr Phe Ser Ser Pro Val Gln Phe
 245 250 255
 ctgattacag ataaaccaac caacggctga ggcgtgcttt tttatittat tactggagct 880
 gcccgccacc ctcttcttgg ttttgattat tcccatcaac tccaagccct ctatcaaggc 940
 ataaattctt atcaataata caatcaatca ccatcatatc atcataagct tgtatatcaa 1000
 ataaacatct ttcaagtitta aattaattta tactataaat tgttgtaata tcattatagt 1060
 tgaagttcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1089
 <210> 2
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Glycine max
 <400> 2

Met Gly Lys Ile Met Leu Val Leu Gly Ser Leu Ile Gly Leu Cys Cys

1 5 10 15

Phe Thr Ile Thr Thr Tyr Ala Phe Ser Pro Ser Gly Trp Thr Asn Ala

20 25 30

His Ala Thr Phe Tyr Gly Gly Ser Asp Ala Ser Gly Thr Met Gly Gly

35 40 45

Ala Cys Gly Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Thr Gly Tyr Gly Thr Arg Thr

50 55 60

Ala Ala Leu Ser Thr Ala Leu Phe Asn Asp Gly Ala Ser Cys Gly Gln

65 70 75 80

Cys Tyr Lys Ile Ile Cys Asp Tyr Lys Ser Asp Ser Arg Trp Cys Ile

85 90 95

Lys Gly Arg Ser Val Thr Val Thr Ala Thr Asn Phe Cys Pro Pro Asn

100 105 110

Phe Ala Leu Pro Asn Asn Asn Gly Gly Trp Cys Asn Pro Pro Leu Lys

115 120 125

His Phe Asp Met Ala Gln Pro Ala Trp Glu Lys Ile Gly Ile Tyr Arg

130 135 140

Gly Gly Ile Val Pro Val Leu Phe Gln Arg Val Pro Cys Lys Lys His

145 150 155 160

Gly Gly Val Arg Phe Ser Val Asn Gly Arg Asp Tyr Phe Glu Leu Val

165 170 175

Leu Ile Ser Asn Val Gly Gly Ala Gly Ser Ile Gln Ser Val Phe Ile

180 185 190

Lys Gly Ser Lys Thr Gly Trp Met Ala Met Ser Arg Asn Trp Gly Ser

195 200 205

Asn Trp Gln Ser Asn Ala Tyr Leu Asn Gly Gln Ser Leu Ser Phe Arg

210 215 220

Val Thr Thr Thr Asp Gly Glu Thr Arg Val Phe Gln Asp Ile Val Pro

225 230 235 240

Val Ser Trp Thr Phe Gly Gln Thr Phe Ser Ser Pro Val Gln Phe

245 250 255

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer
 <400> 3
 nnggatccga ygcntcnggn acnatgggyg gygctgygyt angg 44
 <210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 4
 nnggatacctt kswytgccar tttnsnccccc arttnck 37
 <210> 5
 <211> 519
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Probe
 <400> 5
 gaygcnwsng gnacnatggg ngngcngtgy ggntayggna ayytntaygc nacnggntay 60
 ggnacnmgna cngcngcnyt nwsnacngcn yntttyaayg ayggngcnws ntgyggncar 120
 tgytayaara thathtgyga ytayaarwsn gaywsnmgt ggtgyathaa rggnmgnwsn 180
 gtnacngtna cngcnacnaa yttytgyccn ccnaayttyg cnytnccnaa yaayaaygg 240
 ggntggtgya aycncncnyt naarcaytty gayatggcnc arccngcngtg ggaraarath 300
 ggnathtaym gnggnggnat hgtncngtn ynttycarm gngtnccntg yaaraarcay 360
 gnggnggtnm gnttywsngt naayggmgn gaytayttyg aryngtnyt nathwsnaay 420
 gtngnggng cnggnwsnat hcarwsngtn ttyathaarg gnwsnaarac nggntggatg 480
 gcnatgwsnm gnaaytggg nwsnaaytg carwsnaay 519
 <210> 6
 <211> 269
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> RNA probe(antisense)
 <400> 6
 aauaaaauaa aaaagcacgc cucagccguu gguugguuua ucuguaauca gcuuagaacu 60
 gaacugggcu agagaaaguu ugcccgaug uccaacuuac uggaacaaua ucuuggaaaa 120
 cucuggucuc uccaucagug guggugaccc ugaaggacaa agauugacca uucaaaauacg 180

cauuggauug ccaauuagaa ccccauuuc uugacauugc cauccaucca guuuuugagc 240

cuuuaaugaa cacugauugg auggaucca 269

<210> 7

<211> 389

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RNA probe(sense)

<400> 7

uggauccauc caaucagugu ucauuuaagg cucaaaaacu ggauggaugg caaugucaag 60

aaauugggggu ucuaauuggc aauccaauugc guauuugaau ggucaauuu uguccuucag 120

ggucaccacc acugauggag agaccagagu uuuccaagau auuguuccag uaaguuggac 180

auucggccaa acuuucucua gcccaguca guucuaagcu gauuacagau aaaccaacca 240

acggcugagg cgugcuuuuu uauuuuuuuu cuggagcugc ccgccacccu ucuucugguu 300

uugauuuuuc ccaucaacuc caagcccucu aucaaggcau aaauucuuau caauaaauaca 360

aucaaucacc aucauaucau cauaagcuu 389

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

accaagcttc aacctctcat cattaggc 28

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

accaagcttg gagttgatgg gaataatca 29